

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité
Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Pathogenerkennung durch das
Immunsystem**
Toll-like-Rezeptoren und NF- κ B-Aktivierung

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Bastian Opitz

geboren am 13.2.1976 in Berlin

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. R. R. Schumann
 2. Prof. Dr. H. D. Volk
 3. Prof. Dr. H. Wagner

Datum der Einreichung: 7.5.2001

Datum der Promotion: 17.12.2001

Zusammenfassung

Die angeborene Immunität ist in der Lage, Pathogene schon beim erstmaligen Eindringen zu erkennen und zu bekämpfen. Haupteffektoren der schnellen, angeborenen Immunantwort sind Makrophagen und polymorphkernige neutrophile Granulozyten. Diese erkennen und phagozytieren Pathogene und koordinieren die weitere Immunantwort durch die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen. Die Erkennung mikrobieller Bestandteile, wie Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien bzw. Peptidoglykan (PG) und Lipoteichonsäuren (LTA) Gram-positiver Bakterien, führt zur Aktivierung von unterschiedlichen Proteinkinasen, des Transkriptionsfaktors NF- κ B und zur Freisetzung von Zytokinen.

Mitglieder der *Toll*-Proteinfamilie, sogenannte *Toll-like*-Rezeptoren (TLR), wurden kürzlich als Rezeptoren auf Immunzellen identifiziert, die für die Erkennung solcher mikrobieller Bestandteile verantwortlich sind. Während TLR-4 der LPS-Erkennung dient, und TLR-2 und -6 verschiedene Liganden von Gram-positiven Bakterien binden, blieb die Frage der Erkennung von LTA und verwandten Glykolipiden strittig. Sowohl TLR-2 als auch TLR-4 wurden für diese Rolle diskutiert.

Zielsetzung dieser Arbeit war, die Rolle von TLRs in der LTA- und Glykolipid-Erkennung zu untersuchen. Glykolipide von zwei eng verwandten Treponemen-Spezies, *T. maltophilum* (TM) und *T. brennaborensis* (TB), sowie neuartig aufgereinigte Lipoteichonsäuren von *Staphylococcus aureus* (SA) und *Bacillus subtilis* (BS) wurden eingesetzt, um die nukleäre Translokation von NF- κ B in verschiedenen Zellsystemen zu induzieren. Diese Zellstimulationsexperimente wurden mit verschiedenen TLR-2-negativen Zelllinien sowie mit Peritonealexsudatzellen TLR-4-defizienter C3H/HeJ-Mäuse durchgeführt. Weitere Informationen lieferten TLR-2-Überexpressions-Experimente sowie Zellstimulationen unter Verwendung von anti-TLR-4-Antikörpern. Die Aktivierung von NF- κ B wurde anhand von Gelshifts nachgewiesen. Mit der Überexpression von dominant-negativen Mutanten verschiedener Moleküle der Signalkaskade, mit Kinase-Hemmstoffen und mit Western Blots wurden die intrazellulären Signaltransduktionswege untersucht.

Für Glykolipide von *T. maltophilum* und beide verwendeten Lipoteichonsäuren ließ sich eine klare TLR-2-Abhängigkeit in der Aktivierung von NF- κ B und der Induktion von

proinflammatorischen Zytokinen zeigen. Die Glykolipide von *T. brennaborensis* hingegen waren überraschender Weise gleichzeitig auch TLR-4-Liganden. Beide untersuchten Glykolipide sowie beide LTAs aktivierten einen Signalweg unter Einbeziehung des Adaptermoleküls MyD88 und der NF- κ B-induzierenden Kinase (NIK). Des Weiteren konnte der Einfluß der MAP-Kinasen p42/44 und p38 auf die *Treponema*-Glykolipid- und LPS-induzierte TNF- α -Ausschüttung dargestellt werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß TLR-2 der Hauptrezeptor von Lipoteichonsäuren ist, und TLR-2 und -4 beide Rezeptoren der *Treponema*-Glykolipide sein können. Diese Ergebnisse sollten dazu beitragen, die molekularen Grundlagen der Reaktionen des Immunsystems auf Gram-positive Bakterien und Treponemen zu verstehen.

Schlagerworte: angeborene Immunantwort, *Toll-like* Rezeptoren, NF- κ B, Treponemen, Lipoteichonsäuren

Abstract

The innate immune response to microbial pathogens is able to protect the host after a first pathogen contact. This immediate immune response is largely mediated by macrophages and neutrophils. They recognize and phagocytose pathogens, and coordinate host responses by secreting inflammatory mediators, such as cytokines. The recognition of lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative bacteria, or peptidoglycan (PG) and lipoteichoic acids (LTAs) of Gram-positive bacteria leads to the induction of protein-kinases, the transcription factor NF- κ B, and subsequently the release of proinflammatory cytokines.

Recently, members of the *Toll*-protein-family, the so-called *Toll-like* receptors (TLRs) have been found to be involved in immune cell activation by microbial products. While TLR-4 has been identified as the transmembrane signal transducer for LPS, and TLR-2 and -6 for different ligands originating from Gram-positive bacteria, the molecular basis of recognition of lipoteichoic acids and related glycolipids has not been completely understood: Both, TLR-4 and -2 have been postulated as receptors.

In order to determine the role of TLRs in immune cell activation by *Treponema* glycolipids and LTAs experiments involving TLR-2-negative cell lines, macrophages from TLR-4-deficient C3H/HeJ-mice, cells overexpression TLR-2, and inhibitory TLR-4 antibodies were performed. The induction of NF- κ B was assessed by electrophoretic mobility shift assays.

Glycolipids of two related *Treponema* species, *T. maltophilum* (TM) and *T. brennaborensis* (TB), and LTAs from *Staphylococcus aureus* (SA) and *Bacillus subtilis* (BS) were investigated for induction of nuclear translocation of NF- κ B in different cell systems. Glycolipids from *T. maltophilum* and both LTAs studied revealed TLR-2-dependency in induction of NF- κ B and proinflammatory cytokines. Surprisingly, glycolipids from *T. brennaborensis* were found to be TLR-4-ligands. Furthermore an involvement of the signaling molecules MyD88 and NIK in cell stimulation by LTAs and glycolipids was revealed by dominant-negative overexpression experiments.

The induction of TNF- α by *Treponema* glycolipids furthermore was dependent on activation of MAP kinases p42/44 and p38, as indicated by specific kinase inhibitors. Tyrosinephosphorylation of the p42/44 kinase induced by *Treponema* glycolipids were

detected by western blots.

In summary, the results presented here indicate that TLR-2 is the main receptor for LTAs. Both TLR-2 and -4 serve as receptors for *Treponema* glycolipids. These results may potentially contribute to explain immune responses to Gram-positive bacteria and treponemes.

Keywords: innate immune system, *Toll-like* receptors, NF- κ B, treponemes, lipoteichoic acids

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Die angeborene Immunantwort	1
1.1.2	Die adaptive Immunantwort	2
1.2	Pathogen-assoziierte molekulare Muster	3
1.2.1	Lipoteichonsäuren	3
1.2.2	<i>Treponema</i> -Glykolipide	5
1.3	Mustererkennende Rezeptoren	6
1.3.1	<i>Toll-like</i> -Rezeptoren (TLRs)	8
1.4	Die intrazelluläre Signaltransduktion	10
1.4.1	TLR-Signalkaskade	10
1.4.2	NF- κ B und I κ B	13
1.4.3	Mitogen-aktivierte Kinasen	15
1.5	Aufgabenstellung	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Gewinnung von <i>Treponema</i>-Glykolipiden	19
2.2	Gewinnung von Lipoteichonsäuren	19
2.3	RAW264.7- und CHO/CD14-Zell-NF-κB-Shifts	19
2.3.1	Zellkultur und Stimulation von RAW264.7 und CHO/CD14-Zellen	19
2.3.2	Gewinnung der nukleären Proteine	20
2.3.3	Hybridisierung und Markierung der Oligonukleotide	21
2.3.4	„Elektrophoretic Mobility Shift Assay“	21
2.4	U373MG-Zellstimulation	22
2.4.1	Zellkultur und Stimulation der U373MG-Zellen	22
2.4.2	IL-6-ELISA	22
2.5	HEK293-Zell-Überexpressions-Experimente	23
2.5.1	Transformation und Isolierung von Plasmid-DNA	23
2.5.2	Zellkultur und Transfektion der HEK293-Zellen	24
2.5.3	Stimulation der HEK293-Zellen	24
2.5.4	Galaktosidase- und Luciferase-Bestimmung	24
2.6	Versuche mit C3H/HeJ- und C3H/HeN-Mauszellen	25
2.6.1	Gewinnung von Peritonealexsudatzellen	25
2.6.2	Stimulation, Gewinnung nuklearer Protein und EMSA	25
2.7	TNF-α-Bestimmung in RAW264.7-Zellüberständen	25

2.7.1	Stimulation der RAW264.7-Zellen.....	25
2.7.2	mTNF- α ELISA.....	26
2.7.3	LDH-Bestimmung	26
2.8	Bestimmung der Tyrosinphosphorylierungen der p42/44-Kinase in RAW264.7-Zellysaten	27
2.8.1	Zellstimulation und Aufreinigung der postmitochondrialen Überstände	27
2.8.2	Elektrophorese und Phospho-p42/44- und p42/44-Western-Blot	27
2.9	Statistische Auswertung und benutzte Software	28
3	ERGEBNISSE.....	30
3.1	Die Induktion von NF-κB durch <i>Treponema</i>-Glykolipide und Lipoteichon-säuren in RAW264.7- und CHO/CD14-Zellen	30
3.1.1	Kompetitions- und Supershift-Analyse.....	31
3.2	Die Induktion von hIL-6 in U373MG-Zellen	33
3.3	TLR-Überexpressionen	34
3.4	Die Überexpression von dominant-negativen Signaling-Molekülen	35
3.5	Die Induktion von NF-κB durch <i>Treponema</i>-Glykolipide und Lipoteichon-säuren in Peritonealexsudatzellen von C3H/HeJ- und C3H/HeN-Mäusen	37
3.6	Der Einfluß von anti-TLR-4-Antikörpern auf die NF-κB-Induktion durch <i>Treponema</i>-Glykolipide und Lipoteichonsäuren	38
3.7	Der Einfluß der MAP-Kinasen p42/44 und p38 auf die TNF-α-Induktion in RAW264.7-Zellen	39
3.8	Der Einfluß von MEK1- und p38-Hemmstoffen auf die Glykolipid-induzierte p42/44-Tyrosinphosphorylierung	41
4	DISKUSSION.....	43
4.1	Die Rolle der <i>Toll-like</i>-Rezeptoren	43
4.2	Strukturelle Unterschiede von TLR-2- und -4-Liganden	46
4.3	Die intrazelluläre Signaltransduktion	49
4.4	Die Bedeutung verschiedener mikrobieller Strukturen und der TLRs in Infektionen durch Gram-positive Bakterien und <i>Treponemen</i>	52
4.5	Schlußfolgerungen und Ausblick	55
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	58

6	ANHANG	73
6.1	Danksagung	73
6.2	Veröffentlichungen	74
6.2.1	Originalarbeiten	74
6.2.2	Kongreßbeiträge	74
6.3	Lebenslauf	75
6.4	Eidesstattliche Erklärung	76

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Adapterprotein-1
BS	<i>Bacillus subtilis</i>
CD	„Cluster of differentiation“, Differenzierungsfaktor
CHO	„Chinese hamster ovary cells“, Ovarialzellen des chinesischen Hamsters
<i>d</i>	<i>Drosophila</i>
dn	dominant-negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	„double-stranded“, doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
ECSIT	„evolutionarily conserved intermediate in <i>Toll</i> pathway“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELAM-1	„endothelial cell-leukocyte adhesion molecule“, endotheliales Adhäsionsmolekül
ELISA	„enzyme-linked immunosorbend assay“, Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest
EMSA	„electrophoretic mobility shift assay“, Elektrophorese-Essay
ERK	„extracellular regulated-signal kinase“, extrazellulär regulierte Signalkinase
FCS	„fetal calf serum“, fötales Kälberserum
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
<i>h</i>	human
HEK	„human embryonic kidney cells“, humane embryonale Nierenzellen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie
I κ B	„inhibitory κ B“
IKK	„inhibitory κ B kinase“, Inhibitor- κ B-Kinase
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IRAK	„IL-1R-associated kinase“, IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
JNK	„c-Jun NH ₂ -terminal kinase“
Kdo	„3-desoxy-D-manno-octulosonic acid“
KO	„Knockout“
LAL	„ <i>Limulus</i> amoebocyte lysat“, Limulus-Amöbozyten-Lysat
LB	<i>Luria Broth</i> , Bakterienmedium
LBP	„lipopolysaccharide-binding protein“, LPS-bindendes Protein
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin

LTA	„lipoteichoic acid“, Lipoteichonsäuren
m	„murine“, Maus
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“, Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	„MAPK kinase“, MAPK-Kinase, MEK
MAPKKK	„MAPK kinase kinase“, MAPK-Kinase-Kinase; MEKK
MBP	Mannan-bindendes Protein
MHC	„major histocompatibility complex“, Haupthistokompatibilitätskomplex
MyD88	„myeloid differentiation protein 88“
n. d.	nicht durchgeführt
NF- κ B	„nuclear factor κ B“, Nukleärer Faktor κ B
NIK	„NF- κ B-inducing kinase“, NF- κ B-induzierende Kinase
NO	„nitric oxide“, Stickstoffmonoxid
PAMP	„pathogen-associated molecular pattern“, Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	„phosphate-buffered saline“, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
PEZ	Peritonealexsudatzellen
PG	Peptidoglykan
PI3-kinase	„phosphoinositid-3 kinase“
PRR	„pattern-recognition receptor“, mustererkennender Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	„ <i>Rous sarcoma virus</i> “
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR-AI/II	Makrophagen-Scavenger-Rezeptor Klasse A Typ I/II
ss	„single stranded“, einzelsträngig
TAB	„TAK-1-binding protein“, TAK-1-bindendes Protein
TAK-1	„transforming growth factor β activated kinase 1“, TGF β -aktivierte Kinase-1
TB	<i>Treponema brennaborensis</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TIR	<i>Toll</i> /IL-1R-Domäne
TLR	<i>Toll-like</i> -Rezeptor
TM	<i>Treponema maltophilum</i>
TNF	„tumor necrosis factor“, Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF	„tumor necrosis factor receptor-associated factor“

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Infektionen durch verschiedene Pathogene, wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten. Bei höheren Vertebraten unterscheidet man die angeborene Immunität („innate immunity“) von der erworbenen („adaptive immunity“) Immunität (Medzhitov and Janeway, 1997a). Das erworbene Immunsystem entstand vor ca. 450 Millionen Jahren. Es erlaubt die Wiedererkennung von Pathogenen bei der darauffolgenden Infektion und bot damit einen Selektionsvorteil. Die phylogenetisch ältere angeborene Immunität, von der Formen in allen mehrzelligen Organismen und Pflanzen zu finden sind, blieb jedoch erhalten (Hoffmann *et al.*, 1999). Wesentliche Unterschiede beider Formen der Abwehr liegen in den Mechanismen und Rezeptoren der Pathogenerkennung.

1.1.1 Die angeborene Immunantwort

Wenn Krankheitserreger eine Epithelbarriere überwinden, werden sie sofort von Phagozyten erkannt. Daraufgehend werden durch die unmittelbare, angeborene Immunreaktion, mit Hilfe von Gewebsmakrophagen und neutrophilen Granulozyten, antimikrobiellen Peptiden und des Komplementsystems, die eindringenden Mikroorganismen bekämpft (Aderem and Underhill, 1999). Diese Reaktion kann schon ausreichen, um eine Ausbreitung der Infektion zu verhindern. Anderenfalls steuern die Immunzellen durch die Sekretion von inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen, durch Antigenpräsentation auf Haupthistokompatibilitätsantigenen („major histocompatibility complex II“, MHC II) und durch die Expression kostimulierender Moleküle die weitere angeborene und adaptive Immunantwort (Roitt *et al.*, 1998; Janeway *et al.*, 1999).

Die frühe, unmittelbare Pathogenerkennung erfolgt dabei durch keimbahnkodierte Rezeptoren. Einerseits kodiert nur eine Minderzahl der auf ca. 30000 geschätzten Gene des menschlichen Genomes Proteine des Immunsystems (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001). Andererseits ist die Gruppe der mikrobiellen Pathogene sehr heterogen und weist eine hohe Mutationsrate auf. Ein wichtiger Mechanismus der angeborenen

Immunität besteht daher darin, nicht jedes mögliche Antigen, sondern bestimmte, in der Evolution hoch konservierte Strukturen zu erkennen (Medzhitov and Janeway, 2000).

Beispiele dieser Strukturen, auch Pathogen-assoziierte molekulare Muster („pathogen-associated molecular patterns“, PAMPs) genannt, sind Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane (PG), Lipoteichonsäuren (LTA), Mannane, Glykane, bakterielle DNA und doppelsträngige RNA (Aderem and Ulevitch, 2000; Medzhitov and Janeway, 2000). Diese chemisch sehr verschiedenen Strukturen haben mehrere Gemeinsamkeiten: sie werden von Mikroorganismen jedoch nicht vom Wirt selbst gebildet; sie sind essentiell für die Pathogenität oder das Überleben des Mikroorganismus, und sie kommen in einer Vielzahl der Pathogene vor (Hoffmann *et al.*, 1999; Medzhitov and Janeway, 2000).

Die Rezeptoren der angeborenen Immunität, sogenannte mustererkennende Rezeptoren („pattern-recognition receptors“, PRRs), werden auf verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert (Janeway, 1989; Medzhitov and Janeway, 1997b). Diese Effektorzellen haben Rezeptoren mit einheitlicher Spezifität. Pathogene können also gleichzeitig von einer großen Anzahl dieser Zellen erkannt werden, und die von ihnen hervorgerufene Antwort erfolgt ohne vorherige Proliferation sofort (Medzhitov and Janeway, 2000).

1.1.2 Die adaptive Immunantwort

Haupteffektoren der adaptiven Immunität sind die T- und B-Lymphozyten. Anstelle mehrerer verschiedener Rezeptoren, von denen jeder ein konserviertes Oberflächenmolekül eines Krankheitserregers erkennt, trägt jede ungeprägte T- oder B-Zelle nur Rezeptoren einer einzigen Spezifität. Diese werden durch einen einzigartigen genetischen Mechanismus festgelegt, welcher während der Entwicklung dieser Zellen im Knochenmark und im Thymus abläuft (Roitt *et al.*, 1998; Janeway *et al.*, 1999).

Die Gene für die variablen Regionen der Rezeptoren werden als Gruppen von Gensegmenten (V-, D- und J-Segmente) weitergegeben. Diese Gensegmente werden in unterschiedlichen Lymphozyten zu verschiedensten DNA-Sequenzen zusammengesetzt (somatische Rekombination). Die große Anzahl der T- und B-Zellen in der Gesamtpopulation bewirkt ein fast unbegrenztes Repertoire an Antigenrezeptoren (Roitt *et al.*, 1998; Janeway *et al.*, 1999).

Die darauffolgende somatische Selektion der Antigenrezeptoren steht im Kontrast zur evolutionären Selektion der PRRs. Die somatische Selektion umfaßt verschiedene Mechanismen, in denen autoreaktive Lymphozyten eliminiert und relevante Effektorzellen ausgewählt werden (Roitt *et al.*, 1998; Janeway *et al.*, 1999). Die Präsentation von Antigenen auf antigenpräsentierenden Zellen ohne kostimulierende Signale führt zu einer permanenten Inaktivierung des für das Antigen spezifischen Lymphozyten. Da die Induktion der kostimulierenden Moleküle B7.1 und B7.2 nur nach der Erkennung von PAMPs durch mustererkennende Rezeptoren erfolgt, scheint die angeborene Immunität bedeutend für die Vermeidung von Immunität gegen Selbstantigene und nichtpathogene Umweltantigene zu sein (Medzhitov and Janeway, 2000).

So könnten Autoimmunkrankheiten und Allergien zum Teil durch Störungen dieser Mechanismen erklärt werden (Janeway, 1999; Medzhitov and Janeway, 2000). Mechanismen der angeborenen Immunantwort sind zur Induktion der adaptiven Immunität erforderlich. Die Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen und die gleichzeitige Expression kostimulierender Proteine auf antigenpräsentierenden Zellen bewirken die Aktivierung und die klonale Proliferation der zu diesem Antigen passenden nativen CD4-T-Lymphozyten, die für die Aktivierung von B-Zellen, CD8-T-Zellen und weiterer Makrophagen benötigt werden (Janeway *et al.*, 1999).

1.2 Pathogen-assoziierte molekulare Muster

Die Pathogen-assoziierten molekularen Muster sind in der Evolution hoch konservierte Strukturen. Sie kommen in einer Vielzahl unterschiedlicher Mikroorganismen vor und sind potente Induktoren der angeborenen Immunantwort (Hoffmann *et al.*, 1999; Medzhitov and Janeway, 2000). An dieser Stelle soll ausschließlich auf Lipoteichonsäuren und ihnen eng verwandte Glykolipide als Vertreter der PAMPs eingegangen werden.

1.2.1 Lipoteichonsäuren

LTAs repräsentieren eine Gruppe strukturell verwandter amphiphiler Makromoleküle, welche in der Zellwand einer Vielzahl Gram-positiver Bakterien vorkommen (Wicken

and Knox, 1975). Sie bestehen aus einem Glyceroglykolipidanteil und einer hydrophilen Kette (Abbildung 1). Diese erstreckt sich von dem Glyceroglykolipid, das hydrophob in der Zytoplasmamembran verankert ist, bis in die Peptidoglykanschichten der Zellwand. Aufgrund von Phosphodiestergruppen bilden die Ketten ein negativ oder zwitterig geladenes Netzwerk. Dieses Netz trägt zu den elektromechanischen Eigenschaften der Zellwand bei; es bindet Mg^{2+} -Ionen für verschiedene membranassoziierte Enzyme und scheint eine Rolle in der Regulation autolytischer Enzyme zu spielen (Heptinstall *et al.*, 1970; Cleveland *et al.*, 1975). LTAs scheinen ferner als Carrier in der Teichonsäuresynthese zu fungieren (Lambert *et al.*, 1977).

Poly(glycerophosphat)-LTAs sind für eine große Subgruppe Gram-positiver Bakterien, deren Guanin- und Cytosinanteil der DNA unter 50% liegt, charakteristisch. Sie sind durch eine in Phosphodiesterbindung am Glyceroglykolipid hängende 1,3-Poly(glycerophosphat)-Kette gekennzeichnet (Fischer *et al.*, 1990). Die LTAs von *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis* haben diese klassische Struktur (Archibald and Baddiley, 1966; Iwasaki *et al.*, 1989). Die durchschnittlich 45-50 (SA) bzw. 25-35 (BS) Einheiten der unverzweigten Ketten bestehen aus Glycerol und Phosphat, sie sind teilweise mit D-Alaninestern und α -N-Acetylglucosamin substituiert. Die Ketten sind mit Phosphodiesterbindungen an den Glykolipiden verankert. Diese Glykolipide wurden als Gentiobiosyldiacylglycerol charakterisiert (Fischer *et al.*, 1981; Iwasaki *et al.*, 1989; Fischer, 1994; Morath *et al.*, 2001).

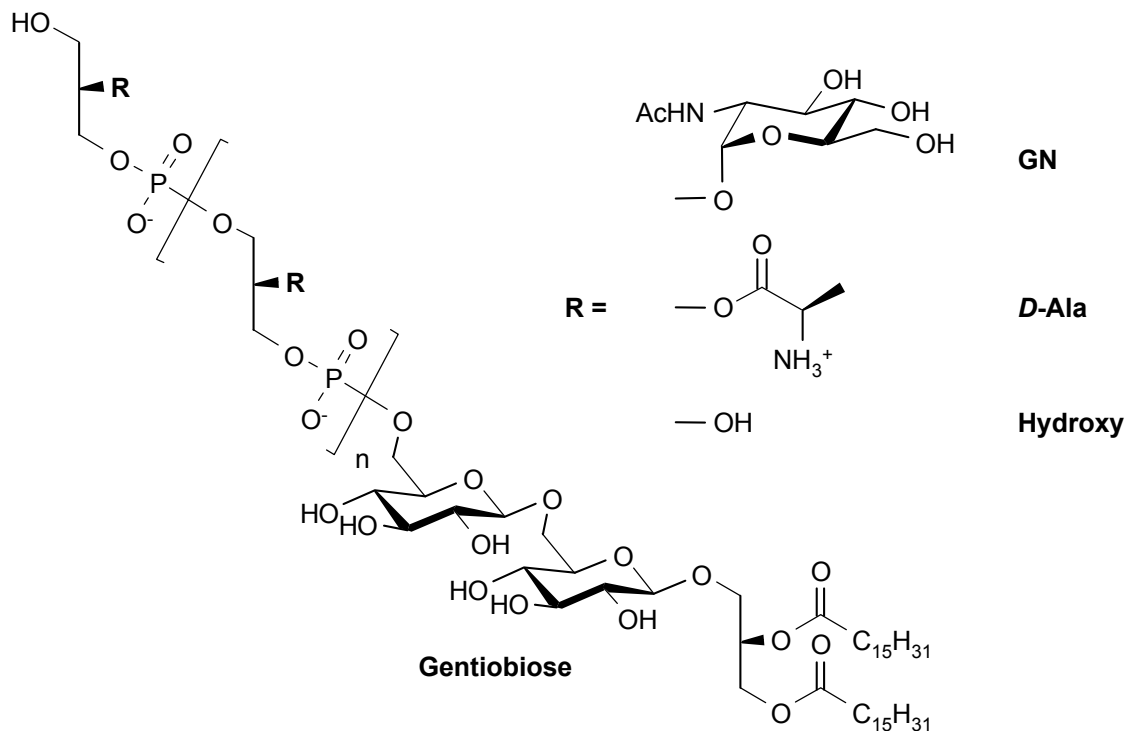


Abbildung 1: Die Struktur der *S. aureus*-LTA

Die Abbildung zeigt die chemische Struktur der Poly(glycerophosphat)-LTA von *S. aureus*. R steht für *D*-Acetylglucosamin (GN), *D*-Alanin-Reste (*D*-Ala) bzw. Hydroxygruppen. In der Klammer ist eine von ungefähr ($n=$) 45-50 Glycerophosphateinheiten dargestellt.

Freie LTAs verursachen unterschiedliche immunologische Reaktionen im Säugetierwirt: Sie aktivieren antikörperunabhängig das Komplementsystem und binden Komplement-aktivierende Lektine. Ferner stimulieren sie in Abhängigkeit des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins (LBP) und des Zelloberflächenmoleküls CD14 Makrophagen und induzieren die Antikörperbildung (Hummel and Winkelstein, 1986; Wicken *et al.*, 1986; Brade *et al.*, 1990; Keller *et al.*, 1992; Fan *et al.*, 1999). Hingegen wurden aufgereinigte LTAs von *Enterococcus hirae*, mit Ausnahme einer kleinen Glykolipidfraktion, als biologisch inaktiv erklärt (Hashimoto *et al.*, 2000).

1.2.2 *Treponema*-Glykolipide

Die zur Familie der *Spirochaetaceae* gehörende Gattung *Treponema* enthält mehrere humanmedizinisch wichtige Spezies, wie beispielsweise *T. pallidum* als Erreger der Syphilis. Treponemen sind strikt anaerob wachsende Bakterien.

Glykolipide aus zwei neu identifizierten, eng verwandten Treponemen-Spezies, *T. brennaborensis* (TB) und *T. maltophilum* (TM), wurden kürzlich beschrieben (Schröder *et al.*, 2000). TB ist mit der Rinderkrankheit digitale Dermatitis und TM mit der Peridontitis im Menschen assoziiert (Choi *et al.*, 1994; Choi *et al.*, 1997; Schrank *et al.*, 1999). Für beide Glykolipide wird eine Struktur aus einem hydrophoben Lipidanker und einer hydrophilen Kette angenommen. Es fehlen verschiedene LPS-typische Komponenten, wie β -hydroxylierte Fettsäuren oder die Zucker Kdo und Heptose (Schröder *et al.*, 2000). Andererseits sprechen ein hoher Phosphatanteil, bestimmte Zucker und Alanin für eine LTA-ähnliche Struktur. Die Annahme, bei den isolierten Glykolipiden handele es sich um LTAs, wurde durch die Identifizierung des Lipidankers des TM-Glykolipides als ein monoacetyliertes Diacylglycerol weiter unterstützt. Die genaue Charakterisierung des Lipidankers von TB blieb jedoch bis zuletzt erfolglos (Schröder *et al.*, 2000). Die *Treponema*-Glykolipide unterscheiden sich von den *S. aureus*- und *B. subtilis*-LTAs hinsichtlich der hydrophilen Ketten. So enthalten die Ketten der Glykolipide neben Phosphat Hexasaccharide (TM) bzw. Glycane (TB).

Beide *Treponema*-Glykolipide zeigen immunstimulatorische Aktivität. So induzieren sie in Monozyten und Makrophagen LBP- und CD14-abhängig inflammatorische Mediatoren (Schröder *et al.*, 2000).

1.3 Mustererkennende Rezeptoren

Funktionell können die Rezeptoren der angeborenen Immunantwort -die mustererkennenden Rezeptoren- in drei Klassen unterteilt werden: sezernierte, endozytierende und signaltransferierende (Medzhitov and Janeway, 2000).

Die sezernierten PRRs wirken als Opsonine. Sie binden an mikrobielle Zellwände und markieren sie zur weiteren Erkennung durch das Komplementsystem und durch Phagozyten. Das am besten charakterisierte Molekül dieser Gruppe ist das Mannan-bindende Protein (Epstein *et al.*, 1996; Fraser *et al.*, 1998). Dieses kalziumabhängige Lektin gehört zur Gruppe der Akute-Phase-Proteine. Das lösliche Mannan-bindende Lektin (MBP) bindet an Kohlenwasserstoffe (C), welche repetitive Strukturen und äquatorielle Orientierungen von C3- und C4-Hydroxylgruppen aufweisen. Solche Zucker sind auf Oberflächen Gram-positiver und -negativer Bakterien, Hefen, Parasiten und einigen

Viren zu finden. Auf Wirbeltierzellen werden sie jedoch von anderen Zuckerresten überdeckt. Das pathogenebundene Mannan-bindende Lektin bewirkt über die MBP-assoziierten Proteasen-1 und -2 die Spaltung des Komplementfaktors C3 und aktiviert damit den Lektin-Weg des Komplementsystems (Epstein *et al.*, 1996; Fraser *et al.*, 1998).

Endozytierende mustererkennende Rezeptoren kommen auf der Oberfläche von Phagozyten vor. Nach der Erkennung bestimmter mikrobieller Musterstrukturen erfolgt die Aufnahme und Zerstörung der Pathogene in Lysosomen. Pathogeneigene Proteine können nun prozessiert und auf MHC-Molekülen der Makrophagenoberfläche präsentiert werden. Gleichzeitig kommt es zur Freisetzung verschiedener Effektoren und Zytokine (Medzhitov and Janeway, 2000). Der Mannose-Rezeptor, ein Mitglied der kalziumabhängigen Lektinfamilie, ist ein solcher endozytierender mustererkennender Rezeptor. Er wird auf Makrophagen, dendritischen Zellen und Endothelzellen exprimiert. Mit seinen verschiedenen lektinähnlichen Kohlenwasserstoff-Erkennungs-Domänen -einzelnen oder in Kombinationen- erkennt er spezifisch, auch ohne vorherige Opsonierung, unterschiedliche Kohlenwasserstoffe auf Mikroorganismen, wie Mannose, Fucose, *N*-Acetylglucosamin und Glucose. Verwandte Zucker finden sich oberflächlich auf Pathogenen, kaum jedoch auf Säugetierzellen (Fraser *et al.*, 1998).

Die Makrophagen-Scavenger-Rezeptoren sind weitere Rezeptoren dieser Gruppe. Typ I und Typ II Klasse A der Scavenger-Rezeptoren (SR-AI/II) erkennen Opsonin-unabhängig bakterielle Zellwandkomponenten, wie LPS oder LTA. Sie sind in die Phagozytose apoptotischer Zellen, in die Endozytose modifizierter Lipoproteine und Cholesterinablagerungen und in die Makrophagenadhäsion involviert. SR-AI/II-defiziente Mäuse sind im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen anfälliger gegen *Listeria monocytogenes*-, *Herpes Simplex Virus*-, *Staphylococcus aureus*- und Malaria-Infektionen sowie gegen LPS-vermittelte Schocks (Kobayashi *et al.*, 2000; Medzhitov and Janeway, 2000).

Die letzte Gruppe der mustererkennenden Rezeptoren ist gekennzeichnet durch die Fähigkeit, die Information der Pathogenerkennung mit Hilfe von Signaltransduktionskaskaden („Signaling“) in die Zelle weiterzuleiten und daraufhin die Expression verschiedener Gene der Immunantwort zu induzieren. Die kürzlich entdeckten Rezeptoren der *Toll*-Familie scheinen eine bedeutende Rolle in der angeborenen Immunantwort zu spielen.

1.3.1 *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs)

Nach den genauen molekularen Mechanismen der zellulären LPS-Erkennung wurde lange Zeit gesucht. Wesentliche Fortschritte für das Verständnis von LPS-Effekten brachte die Entdeckung des LPS-bindenden Proteins (LBP) und des Zelloberflächen-Glykoproteins CD14 (Schumann *et al.*, 1990; Wright *et al.*, 1990). Doch weder das Akute-Phase-Protein LBP, noch das intrazelluläre und transmembranäre Domänen vermissende Glycophosphatidylinositol-verankerte CD14 waren Kandidaten für einen LPS-Signaling-Rezeptor.

Toll wurde erstmalig in *Drosophila melanogaster* als ein für die dorsoventrale Polarisation der Ontogenese entscheidendes Gen identifiziert (Anderson *et al.*, 1985a; Anderson *et al.*, 1985b; Hashimoto *et al.*, 1988). Gay und Keith entdeckten Sequenzhomologien der zytoplasmatischen Domänen von *Toll*-Proteinen und humanen Interleukin-1 Rezeptoren (IL-1R), die TIR-Domänen (Gay and Keith, 1991). Sowohl der humane IL-1-Rezeptor, als auch *Toll* in *Drosophila* (*dToll*) induzieren Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der Nukleären Faktor κ B (NF- κ B)-Familie führen (Belvin and Anderson, 1996). Mitglieder dieser Familie nehmen Schlüsselrollen in der Induktion von Immunantworten in Säugetieren ein (Ghosh *et al.*, 1998). Es stellte sich die Bedeutung der durch *Toll* kodierten Proteinfamilie für die angeborene Immunantwort in *Drosophila* heraus. So werden antifungale und antimikrobielle Proteine nach der Aktivierung von mindestens zwei Mitgliedern der *Toll*-Rezeptorfamilie induziert: *dToll* und *18-wheeler* (Lemaitre *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1997; Anderson, 2000).

Das Immunsystem von *Drosophila* kann zwischen verschiedenen Pathogenen unterscheiden, auf eine Pilzinfektion reagiert es mit der selektiven Aktivierung der *Toll*-Kaskade und der Produktion antifungaler Peptide (Lemaitre *et al.*, 1997). In *Drosophila* ist die Aktivierung einer proteolytischen Kaskade und letztendlich des Peptides *Spätzle*, als Ligand für *dToll*, für die Induktion solcher Immunantworten erforderlich (Hoffmann *et al.*, 1999; Levashina *et al.*, 1999). Inzwischen sind zehn Mitglieder der *Toll*-Familie in *Drosophila* bekannt (Zhang and Ghosh, 2001).

Medzhitov *et al.* fanden 1997 das erste humane *Toll*-Homolog, welches später als *Toll-like*-Rezeptor (TLR)-4 identifiziert wurde. Sie zeigten, daß konstitutiv aktive TLR-4-

Mutanten NF- κ B-abhängige Gene für verschiedene Zytokine und kostimulierende Moleküle aktivieren und bewiesen so deren Bedeutung für die angeborene Immunität (Medzhitov *et al.*, 1997). Bald darauf wurden weitere humane *Toll-like*-Rezeptoren entdeckt und deren Homologie zu *dToll* und der IL-1-Rezeptor-Familie aufgezeigt. Sie wurden als transmembranäre Proteine mit Leucin-reichen extrazellulären Domänen („leucin-rich repeats“) charakterisiert (Chaudhary *et al.*, 1998; Rock *et al.*, 1998).

Weiteren Fortschritt erbrachten TLR-Überexpressions-Studien, die zunächst dazu führten, daß humaner TLR-2 als LPS-Rezeptor postuliert wurde (Kirschning *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Dem widersprach die Identifizierung der für die LPS-Hyporesponsivität von zwei Mausstämmen verantwortlichen Gene als TLR-4-Gene (Poltorak *et al.*, 1998; Qureshi *et al.*, 1999). Inzwischen gilt TLR-4 aufgrund verschiedenster Untersuchungen als wesentlicher physiologischer LPS-Rezeptor (Heine *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 1999; Arbour *et al.*, 2000; Hirschfeld *et al.*, 2000; Tapping *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). Neben TLR-4 und CD14 wurde ein weiteres in die LPS-Erkennung involviertes Protein identifiziert: MD-2, ein sezerniertes Molekül ohne transmembranäre Domäne, das an die extrazelluläre Domäne von TLR-4 und möglicherweise von TLR-2 bindet (Shimazu *et al.*, 1999; Dziarski *et al.*, 2001).

Auch die Rolle von TLR-2 in der Erkennung von PG, bakteriellen Lipoproteinen, ganzen Gram-positiven Bakterien, Mykobakterien und Hefen scheint gesichert (Brightbill *et al.*, 1999; Hirschfeld *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 1999; Underhill *et al.*, 1999a; Underhill *et al.*, 1999b; Yoshimura *et al.*, 1999; Ozinsky *et al.*, 2000). Die genaue Identität des LTA-Rezeptors ist dagegen weiterhin ungeklärt. Schwandner *et al.* identifizierten mit Hilfe von TLR-Überexpressions-Experimenten TLR-2 als Rezeptor für *B. subtilis*-, *S. pyogenes*- und *S. sanguis*-LTAs (Schwandner *et al.*, 1999). Bald darauf wurde die LTA-Erkennung via TLR-4 postuliert: *S. aureus*- und *S. sanguis*-LTA induzierten inflammatorische Mediatoren in TLR-2-Knockout (KO)- und Wildtyp-Mäusen, nicht jedoch in TLR-4-KO-Mäusen (Takeuchi *et al.*, 1999). Schließlich beschrieben Hashimoto *et al.* eine kleine aus *E. hirae*-LTA aufgereinigte Glykolipidfraktion als alleinig für LTA-Effekte verantwortlich. Sie zeigten auf, daß TLR-2 und -4 für Zellstimulationen durch diese Glykolipide notwendig waren (Hashimoto *et al.*, 2000).

Inzwischen wurden neun Mitglieder der TLR-Familie im Menschen identifiziert und sechs weiter teilweise charakterisiert (Zhang and Ghosh, 2001): Neuesten

Erkenntnissen zufolge besteht die Bedeutung von TLR-9 in der Erkennung von Bakterien-DNA (Hemmi *et al.*, 2000). Eine neben der LPS-Erkennung weitere Aufgabe von TLR-4 scheint in der Immunzellaktivierung durch virale Proteine zu liegen (Kurt-Jones *et al.*, 2000). Die Funktionen vieler weiterer Rezeptoren sind noch unbekannt. Umgekehrt sind für einige pathogenassoziierte Liganden noch keine signaltransduzierenden Rezeptoren gefunden. Die Expressionsmuster der TLR-Moleküle unterscheiden sich deutlich: so wird TLR-1 allgegenwärtig; TLR-2, -4, -5 in Phagozyten sowie dendritischen Zellen und TLR-3 nur in dendritischen Zellen exprimiert (Muzio *et al.*, 2000).

Es gibt erste Anzeichen für ein gemeinsames Erkennen pathogener Strukturen durch mehrere TLRs. So wurde gezeigt, daß TLR-2 und -6 nach ihrer Rekrutierung in Phagosomen PG identifizieren und eine dem Pathogen angepaßte Immunantwort steuern (Underhill *et al.*, 1999a; Aderem and Ulevitch, 2000; Ozinsky *et al.*, 2000). Die Erkennung von Lipoproteinen erfolgt hingegen durch TLR-2, ohne die Mitwirkung von TLR-6 (Ozinsky *et al.*, 2000).

Die Frage, ob LPS und andere Liganden direkt an die TLRs binden oder, in Analogie zu *Drosophila*, eine proteolytische Kaskade initiieren, ist noch nicht endgültig geklärt. Aktuelle Daten sprechen für eine direkte Bindung von LPS an TLR obwohl „formelle“ Bindungsstudien bisher fehlen (Lien *et al.*, 2000; Poltorak *et al.*, 2000).

1.4 Die intrazelluläre Signaltransduktion

1.4.1 TLR-Signalkaskade

Die in *dToll*, IL-1R und TLR gefundenen TIR-Domänen weisen auf homologe, über IL-1R, *dToll* bzw. TLRs induzierte, hoch konservierte Signalingkaskaden hin (Rock *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2000). Diese Kaskaden stellen intrazelluläre biochemische Abläufe zur Weiterleitung von Informationen dar. Verschiedene Protein-Protein-Interaktionen, Konformationsänderungen und Phosphorylierungen durch Proteinkinasen führen zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und damit zur Transkription der für die immunologische Antwort notwendigen Gene. Zuerst wurde dieser Signaling-Weg in der Zellstimulation durch IL-1 charakterisiert.

Die Aktivierung von IL-1R induziert die Aggregation des Proteins „IL-1 receptor-

associated protein“, die Bindung des Adapter-Proteins MyD88 und -eventuell über das Protein Tollip vermittelt- die Aktivierung der Kinasen „IL-1R-associated kinase“ (IRAK), IRAK-2 und IRAK-M (Greenfeder *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 1996a; Muzio *et al.*, 1997; Wesche *et al.*, 1997; Wesche *et al.*, 1999; Burns *et al.*, 2000). Die IRAK-Kinasen binden einen Komplex mit dem Adapter-Protein „tumor necrosis factor receptor-associated factor 6“ (TRAF6) (Cao *et al.*, 1996b). Die weiteren Schritte des Signalweges sind weniger eindeutig. Schließlich phosphoryliert der Kinasekomplex „inhibitory κ B (I κ B) kinase (IKK) complex“, bestehend aus den beiden Kinasen IKK α und IKK β , dem Regulator-Protein IKK γ /NEMO und der Phosphatase Shp-2 das Inhibitorprotein I κ B (DiDonato *et al.*, 1997; Mercurio *et al.*, 1997; Regnier *et al.*, 1997; Woronicz *et al.*, 1997; Zandi *et al.*, 1997; Rothwarf *et al.*, 1998; Yamaoka *et al.*, 1998; You *et al.*, 2001). Neuere Daten lassen auf IKK β als hauptsächlich verantwortlich für die inflammatorisch induzierte I κ B-Proteolyse schließen (Delhase *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 1999).

Die Phosphorylierung von I κ B an zwei Serylresten durch den IKK-Komplex bewirkt die Konjugation von Ubiquitinmolekülen an zwei Lysylreste I κ B's durch eine E3-Ubiquitin-Ligase (Yaron *et al.*, 1998). Diese Ligase steht am Ende einer Kaskade von Ubiquitin-konjugierten Enzymen. Als letzter Schritt folgt das Erkennen des phosphorylierten und Ubiquitin-konjugierten I κ B's durch 26S Proteasomen, die nachfolgende Proteolyse und die Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Karin and Ben-Neriah, 2000).

Viele unterschiedliche Proteinkinasen wurden als mögliche Aktivatoren des IKK-Komplexes beschrieben: Proteinkinase-C-Isoformen sowie Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase-Familienmitglieder wie NIK, AKT/PKB, MEKK-1, MEKK-2/-3, COT/TPL-2 oder TAK-1 (Ghosh *et al.*, 1998; Karin and Ben-Neriah, 2000). Als sehr wahrscheinlich gilt eine Aktivierung des IKK-Komplexes unter Beteiligung der Adapterproteine TRAF6, „TAK-1-binding protein 1“ (TAB1) und TAB2 sowie der Kinasen „transforming growth factor β activated kinase 1“ (TAK-1) und „NF- κ B-inducing kinase“ (NIK) (Malinin *et al.*, 1997; Woronicz *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1998; Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999; Irie *et al.*, 2000). Zusätzlich wurde eine Induktion des IKK-Komplexes über eine Kaskade aus TRAF6, dem „evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway“ (ECSIT) und MEKK-1 postuliert (Zhang and Ghosh, 2001).

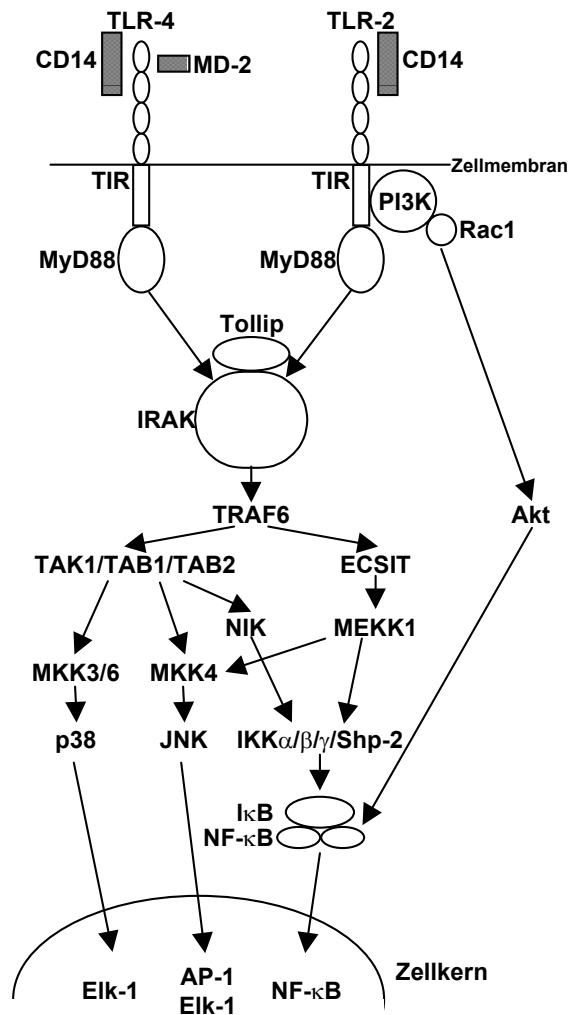


Abbildung 2: Die TLR-aktivierte Signalkaskade

Der Erkennung von unterschiedlichen PAMPs durch TLR-2, CD14 und möglicherweise MD-2 bzw. durch TLR-4, CD14 und MD-2 folgen intrazelluläre Signalkaskaden. Der IRAK-TRAF6-Signalweg wird durch TLR-2 und -4 initiiert. Die PI3-Kinase-Rac-Akt-Kaskade wird durch TLR-2, vermutlich jedoch nicht durch TLR-4 induziert. Diese Kaskaden führen zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB, Elk-1 und AP-1 und dadurch zur Induktion verschiedener für die angeborene Immunantwort bedeutender Gene. Zu ihnen gehören Zytokine-kodierende Gene (wie zum Beispiel TNF-α, IL-6 und IL-1).

Zusätzliche Aktivierungswege von NF-κB sind beschrieben worden. Es konnte eine Regulation der NF-κB-Aktivität, ohne Beeinflussung der IκB-Proteolyse, der Kernwanderung oder der NF-κB-DNA-Bindung aufgezeigt werden (Arbibe *et al.*, 2000). Dieser Prozeß wird ebenfalls über TLRs initiiert; er scheint aber selektiv an TLR-2 und eventuell TLR-1 und -6 assoziiert (Abbildung 2). Diese TLRs induzieren eine Kaskade,

welche unter anderem aus dem Protein Rac1, der Phosphoinositid-3 (PI3)-Kinase und der Kinase Akt besteht (Arbibe *et al.*, 2000).

Die analoge, durch *dToll* induzierte Signaltransduktion weist homologe Proteine auf: *Tube/MyD88*, *Pelle/IRAK*, *LPS-activated kinase/IKK*, *Cactus/I κ B*, *Dorsal/NF- κ B* (Hoffmann *et al.*, 1999; Zhang and Ghosh, 2001).

Auch in der TLR-Signalkaskade der Säugetiere konnten verschiedene Moleküle der IL-1R- bzw. *dToll*-Kaskade nachgewiesen werden (Abbildung 2). MyD88 besteht aus drei funktionellen Domänen: einer *death*-Domäne, einer intermediären Domäne und einer TIR-Domäne. Mehrere Arbeiten beschreiben eine Interaktion der TIR-Domänen von TLR-4 und MyD88 und eine Einbindung von IRAK und TRAF6 in die TLR-4-induzierte Kaskade (Medzhitov *et al.*, 1998; Muzio *et al.*, 1998). Weiterhin konnte eine LPS-Resistenz von MyD88-KO-Mäusen gezeigt werden. Bemerkenswert war indes die Tatsache, daß auch in diesen Mäusen Lipid A als biologisch aktiver Anteil von LPS NF- κ B aktivierte (Kawai *et al.*, 1999). Dominant-negative (dn) MyD88-, IRAK-, TRAF6-, TAK1-, NIK-, IKK α - und IKK β -Mutanten blockierten Zellaktivierungen durch konstitutiv aktive TLR-4, sowie durch LPS, *S. aureus*, *M. tuberculosis* oder Zymosan (Kirschning *et al.*, 1998; Muzio *et al.*, 1998; Underhill *et al.*, 1999a; Zhang *et al.*, 1999; Irie *et al.*, 2000).

1.4.2 NF- κ B und I κ B

NF- κ B kann durch unterschiedliche, vor allem inflammatorische und streß-assoziierte Stimuli aktiviert werden. Neben verschiedenen mikrobiellen Agenzien (über TLRs) können Zytokine, wie beispielsweise IL-1 und TNF- α sowie proapoptotische Stimuli, wie UV-Licht und freie Sauerstoffradikale, NF- κ B aktivieren. 1986 wurde NF- κ B erstmalig in B-Zellen beschrieben (Sen and Baltimore, 1986). Heute werden unter dem Namen NF- κ B verschiedene induzierbare Transkriptionsfaktoren zusammengefaßt.

Strukturell handelt es sich um Dimere aus Mitgliedern der *Rel*-Familie von DNA-bindenden Proteinen. Fünf *Rel*-Proteine wurden in Säugetieren identifiziert: NF- κ B1 (p50 mit seinem Präkursor p105), NF- κ B2 (p52 und sein Präkursor p100), c-Rel, RelA (p65) und RelB. Drei *Rel*-Proteine -*Dorsal*, *Dif* und *Relish*- wurden in *Drosophila* gefunden (Ghosh *et al.*, 1998). Allen *Rel*-Proteinen ist eine hoch konservierte, 300

Aminosäuren umfassende *Rel*-Homologie-Region gemeinsam. Diese Region ist verantwortlich für die Dimerisation, die DNA-Bindung und die Interaktion mit dem I κ B Protein. Sie enthält außerdem eine Kern-Lokalisations-Sequenz (Ghosh *et al.*, 1998). Verschiedene NF- κ B-Dimere haben unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu DNA- κ B-sites. Alle κ B-sites enthalten die Konsensussequenz $5'$ GGGRNNYYCC $3'$ (R=Purinbase, Y=Pyrimidinbase und N=R oder Y). Die *Rel*-Proteine unterscheiden sich zudem in ihrer Fähigkeit, die Transkription zu aktivieren. Nur für RelA/p65 und c-Rel konnte eine die Transkription aktivierende Wirkung nachgewiesen werden. Dimere aus anderen *Rel*-Proteinen, wie zum Beispiel p50- oder p52-Homodimere scheinen die Transkription zu hemmen. „Knockout“-Studien zeigten spezifische Funktionen unterschiedlicher *Rel*-Proteine (Ghosh *et al.*, 1998).

Inaktive NF- κ B-Proteine sind im Zytosol an Inhibitor-Proteine der I κ B-Familie gebunden (Baeuerle and Baltimore, 1988a, b). Zu ihnen gehören I κ B α , I κ B β , I- κ B χ , I κ B ϵ und Bcl-3; die Präkursor p105 und p100 sowie das *Drosophila*-Protein *Cactus*. Jede Isoform bindet präferenziell an unterschiedliche Kombinationen von *Rel*-Proteinen. Allen I κ B-Isoformen gemeinsam sind repetitive Ankyrin-reiche Domänen, welche an *Rel*-Homologie-Regionen binden und die NF- κ B-Kern-Lokalisations-Sequenzen maskieren (Ghosh *et al.*, 1998). Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation der NF- κ B-Aktivierung. Die Stimulus-abhängige proteolytische Degradation verschiedener I κ B-Mitglieder bewirkt die Kernwanderung von NF- κ B, die Transkription und damit die Induktion von unterschiedlichen Zytokinen, Akute-Phase-Proteinen und Zell-Adhäsions-Molekülen (Ghosh *et al.*, 1998; Karin and Ben-Neriah, 2000).

NF- κ B-Bindungsstellen auf dem I κ B α -Promotor bewirken andererseits auch die Induktion von I κ B α durch NF- κ B. I κ B α bindet nach der Kernwanderung an NF- κ B und verstärkt damit die Dissoziation von der DNA (Ghosh *et al.*, 1998; Karin and Ben-Neriah, 2000). Dagegen scheint I κ B β die persistierende Aktivierung von NF- κ B bei andauernder Präsenz aktivierender Agenzien zu bewirken (Ghosh *et al.*, 1998). I κ B ϵ ist vermutlich ein spezifischer Inhibitor von p65- und c-Rel-Komplexen und damit ein selektiver Regulator bestimmter Gene zu sein (Ghosh *et al.*, 1998; Karin and Ben-Neriah, 2000). Bcl-3 hat eine Bindungsspezifität für die inhibierenden p50- und p52-Homodimere. Die durch Bcl-3 bewirkte Transkriptionsaktivierung könnte aus der

Hemmung dieser Inhibitoren oder aus einer direkten Aktivierung durch p52-Bcl-3-Komplexe resultieren (Ghosh *et al.*, 1998).

NF- κ B reguliert die Transkription vieler, insbesondere für die Entzündung und Immunantwort wichtiger Gene. So enthalten die Gene für die Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-8 oder für die kostimulierende Moleküle B7.1 und B7.2 κ B-Sequenzen in ihren Promotoren. In den meisten Zellen schützt die NF- κ B Aktivierung vor der Apoptose (Ghosh *et al.*, 1998; Karin and Ben-Neriah, 2000).

1.4.3 Mitogen-aktivierte Kinasen

Die Mitogen-aktivierten Kinasen (Mitogen-activated protein kinases, MAPKs)-Kaskaden kommen in allen eukariotischen Zellen vor. Sie werden durch Zellstreß, Hormone, Neurotransmitter oder Zytokine induziert und regulieren einerseits die Expression von Genen und andererseits zytoplasmatische Aktivitäten. Diese Signalkaskaden bestehen aus MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKK; MEKK), welche MAPK-Kinasen (MAPKK, MEK) phosphorylieren und aktivieren, die wiederum MAPKs aktivieren (Widmann *et al.*, 1999). Jedes dieser Enzyme kommt in verschiedenen Isoformen vor. Des Weiteren sind verschiedene Gerüstproteine bekannt, welche die Spezifität der Signalwege zu erhöhen scheinen (Schaeffer and Weber, 1999). Dieser Aufbau dient nicht nur der Signalweiterleitung, sondern insbesondere auch der präzisen Regulation der Kinetik, Dauer und Amplitude der Aktivität (Widmann *et al.*, 1999).

Zu den nach den MAPKs benannten Kaskaden gehören die „extracellular regulated-signal kinase“ 1 (ERK1, p44)- und ERK2 (p42)-Kaskaden, welche präferenziell das Zellwachstum und die Differenzierung regulieren (Abbildung 3). Sie bestehen aus dem G-Protein Ras, aus der MAPKKK Raf, der MAPKK MEK und den MAPKs ERK1/2 (Kolch, 2000). ERK1 und 2 scheinen funktionell und biochemisch äquivalent, und es ist bislang ungeklärt, warum zwei ERK-Gene existieren. Weitere Beispiele umfassen die „c-Jun NH₂-terminal kinase“ (JNK)- und die p38 MAPK-Kaskaden, welche vor allem Streßantworten, wie Entzündung und Apoptose kontrollieren (Ip and Davis, 1998; Lewis *et al.*, 1998). Eine enge Vernetzung und ein wechselseitiger Signalfluß zwischen den Kaskaden findet statt (Schaeffer and Weber, 1999).

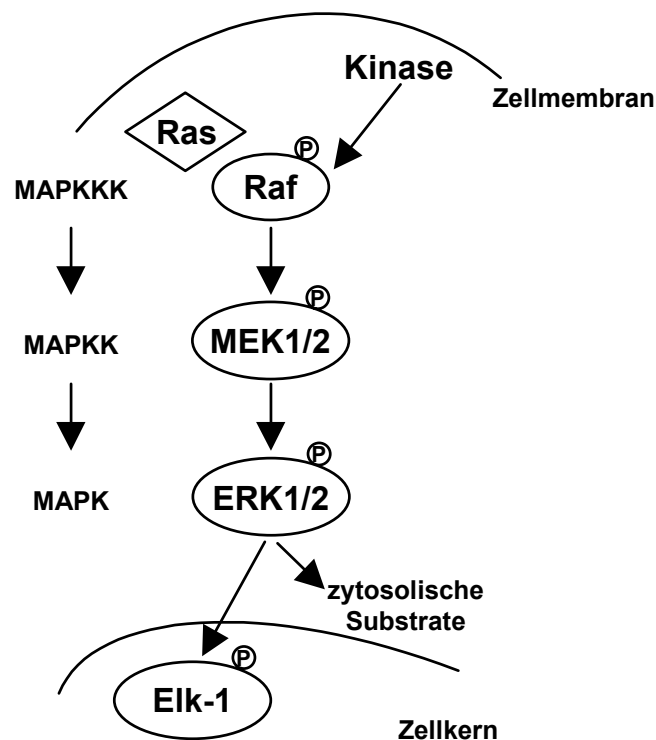


Abbildung 3: Die ERK-MAPK-Kaskade

Verschiedene Stimuli, wie beispielsweise Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sowie Zellstreß induzieren die ERK-Kaskade. Sie umfaßt das G-Protein Ras, die MAP-Kinase-Kinase-Kinase Raf, die MAP-Kinase-Kinasen MEK1 und -2 sowie die MAP-Kinasen ERK1 und -2. ERK1/2 steuern zytosolische Vorgänge und aktivieren Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel Elk-1.

In ruhenden Zellen sind die MAPKs an Zytoskelettelementen im Zytosol gehaftet (Reszka *et al.*, 1995). Extrazelluläre Stimulationen bewirken die Phosphorylierung an Threonin und Tyrosin der Aktivierungsdomäne. Die verschiedenen MAPKs unterscheiden sich in dem diese beiden Aminosäuren enthaltendem TXY-Motiv. Die Phosphorylierung induziert die Aktivierung und die nukleäre Translokation der Kinasen (Nick *et al.*, 1996; Canagarajah *et al.*, 1997; Khokhlatchev *et al.*, 1998). Phosphatasen sind an der negativen Regulation beteiligt (Gopalbhai and Meloche, 1998). Die MAPKs p42/44, p38 und JNK sind Seronin/Threonin-Kinasen, welche Prolin an bestimmten Positionen ihrer Substrate erkennen und diese daraufhin an den Aminosäuren Seronin bzw. Threonin phosphorylieren (Schaeffer and Weber, 1999). Zu ihren Substraten gehören Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel das Adapterprotein-1 (AP-1) und Elk-1,

Zytoskelettproteine, Proteinkinasen sowie Phospholipasen (Widmann *et al.*, 1999). LPS induziert die Phosphorylierung der MAPKs p42/44, p38 und JNK (Han *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994; Hambleton *et al.*, 1995; Hambleton *et al.*, 1996).

1.5 Aufgabenstellung

Wichtige Mechanismen der angeborenen Immunität umfassen die schnelle Erkennung von PAMPs durch immunkompetente Zellen. LTAs konnten als wichtige PAMPs der Gram-positiven Bakterien charakterisiert werden. Hingegen blieben die Mechanismen, mit denen Treponemen die Immunantwort induzieren bislang weitestgehend ungeklärt. LTA-ähnliche *Treponema*-Glykolipide wurden kürzlich aufgereinigt und in ihren immunstimulatorischen Aktivitäten ansatzweise charakterisiert. TLRs konnten ferner vor kurzem als maßgebliche signaltransduzierende Rezeptoren vieler Immunzellen identifiziert werden. Verschiedene Mitglieder dieser Proteinfamilie wurden für die Erkennung von unterschiedlichen PAMPs verantwortlich erklärt. Die Involvierung von TLRs in die Immunantwort auf LTAs blieb kontrovers. Sowohl TLR-2, als auch TLR-4 wurden für diese Rolle diskutiert. Die Ursachen für diese widersprüchlichen Ergebnisse waren möglicherweise unzureichende LTA-Extraktionen der verwendeten LTAs.

Im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation ist es beabsichtigt, die zellstimulierenden Effekte von LTAs und verwandten *Treponema*-Glykolipiden zu analysieren. Hierfür wurden LTAs von *S. aureus* und *B. subtilis* verwendet, die nach einer neuartigen, besonders schonenden Butanol-Methode aufgereinigt wurden. Ferner wurden Glykolipide von zwei kürzlich charakterisierten Treponemen-Spezies, *T. brennaborensis* und *T. maltophilum*, untersucht. Zielsetzung war es insbesondere zellstimulatorischen Kapazitäten der LTAs und der Glykolipide zu überprüfen. Hierfür sollte eine eventuelle Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B in verschiedenen Zellen nachgewiesen werden. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit sollte ferner darin liegen, eine möglichen Involvierung von TLRs in die Immunzellstimulation durch die untersuchten PAMPs zu analysieren. Weiterhin war eine Untersuchung der initiierten intrazellulären Signaling-Wege, insbesondere der TLR-NF- κ B- und der MAPK-Kaskaden, geplant.

2 Material und Methoden

2.1 Gewinnung von *Treponema*-Glykolipiden

Die Gewinnung der *Treponema*-Glykolipide wurde durch Nicolas Schröder (Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité, Berlin) nach der Phenol-Wasser-Extraktionsmethode durchgeführt und beschrieben (Schröder *et al.*, 2000). Nennenswerte LPS-Kontaminationen konnten durch den *Limulus* (LAL)-Essay (QCL-1000, Bio Whittaker, Walkersville, USA) ausgeschlossen werden. Ein sämtliche während der Extraktion verwendete Medien und Chemikalien enthaltendes „Mock“-Extrakt wurde hergestellt und bei allen Experimenten parallel getestet.

2.2 Gewinnung von Lipoteichonsäuren

Die LTAs von *Bacillus subtilis* (DSMZ 1087) und *Staphylococcus aureus* (DSM 20233) wurden freundlicherweise durch PD Dr. T. Hartung (Institut für Biochemische Pharmakologie, Universität-Konstanz, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Beide LTAs wurden gleichartig, mit einem neuen, kürzlich beschriebenen Butanol-Verfahren extrahiert und mittels einer Hydrophoben-Interaktions-Chromatographie (HIC) weiter aufgereinigt (Morath *et al.*, 2001). Alle Präparationen waren im LAL-Essay negativ.

2.3 RAW264.7- und CHO/CD14-Zell-NF- κ B-Shifts

2.3.1 Zellkultur und Stimulation von RAW264.7 und CHO/CD14-Zellen

Die Mausmakrophagen-Zelllinie RAW264.7 (American Type Culture Collection ATCC, Rockville, USA) wurde in RPMI1640-Medium (Life Technologies Ltd, Paisley, UK) mit 1 % Glutamat, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Die Ovarialzellen des chinesischen Hamsters „Chinese hamster ovary cells“ (CHO), die CD14 durch stabile Transfektion exprimierten (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Dr. L. Hamann, Forschungszentrum Borstel, Deutschland) wurde in Ham's nutrient-Medium F-12 (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich) mit 1 % Glutamat, 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FCS und 400 μ g/ml Hygromycin B

(Calbiochem, San Diego, USA) kultiviert.

$1,6 \times 10^6$ RAW264.7-Zellen oder 4×10^5 CHO/CD14-Zellen pro Vertiefung wurden in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit FCS-freiem RPMI-Medium gewaschen sowie 3 h darin inkubiert und daraufhin mit unterschiedlichen Konzentrationen an *Treponema*-Glykolipiden, LTAs, *E. coli* 0111:B4-LPS (Sigma, Deisenhofen) oder *S. minnesota* Re595-LPS (Sigma) stimuliert. Die Stimulation erfolgte in Anwesenheit von 2 % nicht hitzeinaktiviertem FCS für 1 h. In einigen Experimenten wurden die Zellen 1 h vor der Stimulation mit dem anti-TLR-4-MD-2-Antikörper MTS510 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. K. Miyake, Saga Medical School, Japan; [Akashi *et al.*, 2000]) in Konzentrationen von 5 µg/ml vorinkubiert.

2.3.2 Gewinnung der nukleären Proteine

Zur Herstellung der nukleären Proteine wurden die Zellen mit eiskalten PBS/1 mM Na_3VO_4 gewaschen und für 20 min in 150 µl Puffer A (10 mM HEPES, 10 mM KCL, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1 mM Na_3VO_4 , 0,5 mM PMSF, 1 mM Leupeptin und 1 mM NaF) inkubiert. Darauffolgend wurden die Zellen vorsichtig abgeschabt, und die Zellsuspensionen in 1,5-ml-Eppendorfgefäße überführt. Nach der Zugabe von jeweils 15 µl 10 %igem Nonidet NP40 wurden die Suspensionen bei 4 °C mit 13000xg für die Dauer von 1 min zentrifugiert. Die Pellets wurden mit je 50 µl Puffer B (400 mM NaCl, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1 mM Na_3VO_4 , 0,5 mM PMSF, 1 mM Leupeptin und 1 mM NaF) resuspendiert und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 13000xg und 4 °C folgte.

Die gewonnenen Überstände enthielten die nukleären Proteine. Die Überstände wurden in 1,5-ml-Eppendorfgefäße überführt und deren Proteinkonzentrationen nach Bradford (Bio-Rad-Protein-Essay, Bio-Rad, München) gemessen. Dafür wurden deren Extinktionen bei 595 nm bestimmt und die Konzentrationen anhand einer Eichreihe ermittelt. Die Überstände wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.3 Hybridisierung und Markierung der Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide enthielten die NF- κ B-Konsensussequenz 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3' (Eurogentec, Seraing, Belgien). Zur Herstellung der Doppelstrang-Oligonukleotide (hybridisieren oder „annealen“) wurden äquimolare Mengen der komplementären Einzelstränge in T4-PNK-Puffer (USB, Cleveland, USA) im Thermocycler für 2 min bei 95 °C denaturiert und über einen Zeitraum von 2 h abgekühlt.

Nach dem „Annealen“ wurden die doppelsträngigen Oligonukleotide durch Phosphorylierung mit dem Phosphorisotop ^{32}P am 5'-Ende radioaktiv markiert. Dafür wurde die DNA zusammen mit dem Enzym T4-Polynukleotidkinase (USB) und $\gamma^{32}\text{-P-dATP}$ (New England Nucleotids NEN, Zaventem, Belgien) im T4-PNK-Reaktionspuffer für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die markierte doppelsträngige DNA wurde chromatographisch in Nick-Säulen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) von den freien Radionukleotiden abgetrennt und in 1,5-ml-Gefäßen aufgefangen.

2.3.4 „Elektrophoretic Mobility Shift Assay“

Der „Elektrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA) ist eine Methode, bei der radioaktiv markierte doppelsträngige DNA-Oligonukleotide durch spezifische Proteinbindungen ihr Laufverhalten im Elektrophoresegel gegenüber freier DNA ändern.

Reaktionsansätze aus je 4 μg nukleären Proteinen, markierten doppelsträngigen Oligonukleotiden und 2fach-Bindungspuffern (25 ml HEPES pH 7,8, 70 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 10 % Glycin, 1 % NP-40, 0,1 % PMSF, 100 ng/ μl poly-dIdC [Roche Molecular Biochemicals, Mannheim] und 0,5 mM DTT) wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Ansätze wurden in einem 10 %igem Polyacrylamid-Gel mit 0,5fach-TBE als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurde das Gel auf Filterpapier getrocknet und Filme für mehrere Stunden exponiert.

Beim „Supershift-Essay“ wurden den Reaktionsansätzen aus nukleären Proteinen, markierter ds-DNA und Bindungspuffern noch jeweils 2 μl von anti-p50-, -p52- und -p65-Antikörpern (Santa Cruz, Heidelberg) hinzugefügt. Die Antikörper verändern nach spezifischer Bindung die Laufeigenschaften der DNA-Protein-Komplexe. Des weiteren

wurde einigen Ansätzen spezifische unmarkierte ds-DNA und unspezifische unmarkierte ds-DNA in 10fach molaren Überschuß zur Competition hinzugegeben.

2.4 U373MG-Zellstimulation

2.4.1 Zellkultur und Stimulation der U373MG-Zellen

Die humane Astrozytom-Zelllinie U373MG (ATCC) wurde in DMEM-Medium (Life Technologies Ltd) mit 1 % Glutamat, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % FCS kultiviert. $3,75 \times 10^4$ U373MG-Zellen pro Vertiefung wurden in 96-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit DMEM-Medium gewaschen und 16 h mit *Treponema*-Glykolipiden, LTA und *E. coli* 0111:B4-LPS in der Anwesenheit von 5 % AB-Serum (ABS) stimuliert.

2.4.2 IL-6-ELISA

Die Konzentrationen von hIL-6 in den U373MG-Zellüberständen wurde mittels eines Sandwich-ELISA (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) gemessen. Hierfür wurden MaxiSorp-ELISA-Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) mit 3 µg/ml anti-hIL-6-Antikörpern (R&D Systems, Wiesbaden) in 100 mM Na₂CO₃ (pH 8,3) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurden nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (PBS, 0,05 % Tween20) die freien Proteinbindungsstellen mit Blockierungspuffer (PBS, 0,05 % Tween20, 10 % FCS) für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Daraufhin folgte, wie auch vor jedem weiteren Schritt, ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer. Nun wurden eine Standardreihe mit hIL-6 (R&D) sowie die U373MG-Zellüberstände in 1:2-Verdünnungen auf die ELISA-Platten aufgetragen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Bei Raumtemperatur erfolgte auch die Detektion mit 25 ng/ml Biotin-konjugierten anti-hIL-6-Antikörpern (R&D) für 1 h und darauffolgend mit 1 µg/ml Streptavidin-Peroxidase für 1 h, jeweils in dem Blockierungspuffer. Die Substratreaktion erfolgte mit Ortho-Phenyl-Diphosphat (Sigma) als Substrat. Nach dem Abstoppen der Farbreaktion durch 2 M H₂SO₄ wurde die Extinktion mit einem Spektrometer (SpectraFluor Plus,

Tecan, Crailsheim) gemessen, und die jeweilige Konzentrationen anhand der Standardkurve ermittelt. Die Absolutwerte der gemessenen IL-6-Konzentrationen lagen im Bereich zwischen 130 pg/ml und 600 pg/ml.

2.5 HEK293-Zell-Überexpressions-Experimente

2.5.1 Transformation und Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Überlassung der TLR-, dnMyD88 und dnNIK-kodierenden Plasmide (auf pFlag-CMV-1 Expressionsvektor) bin ich Dr. Carsten J. Kirschning (Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU-München) sehr dankbar. Des Weiteren wurden RSV- β -Galaktosidase-kodierende Plasmide (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Werner Hallatschek, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité, Berlin) und NF- κ B-Bindungsstellen enthaltene ELAM-1-Luciferase-Reporter-Plasmide (Schindler und Baichwal, 1994) verwendet.

Für die Transformation in *E. coli XL1-Blue* wurden 100 μ l dieser kompetenten Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Michaela Müller, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité, Berlin) mit 1 μ g Plasmid-DNA für 30 min auf Eis, für 2 min bei 42 °C und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde nun mit 900 μ l LB-Medium (1 % Bacto-Tryptan, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl) versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Jeweils 100 μ l wurden auf Selektionsagar (LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin, Agar/Difco, Detroit, USA) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden weiße Kolonien ausgewählt und daraus 5 ml-Vorkulturen in LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin hergestellt.

Die Vorkulturen wurden für die Dauer von 10 h kultiviert. Nach dieser Zeit wurden jeweils mit 2 ml dieser Vorkulturen „Minipreps“, nach den Instruktionen des Herstellers (QiaQuick-Miniprep-kit, Qiagen, Hilden), durchgeführt. Die hierbei isolierten DNAs wurden mittels Restriktionsverdau auf ihre Identität geprüft. Für die Hauptkulturen wurden jeweils 1 ml der Vorkulturen in 100 ml LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen bei 4500xg für 15 min abzentrifugiert; und die Plasmid-DNA wurde mittels „Maxiprep“, nach Anleitung des Herstellers (Plasmid Maxi-kit, Qiagen) isoliert. Mittels Extinktions-Messungen bei

260 nm wurden die DNA-Konzentrationen ermittelt.

2.5.2 Zellkultur und Transfektion der HEK293-Zellen

Die humanen embryonalen Nieren-(HEK)293-Zellen (Tularik, South San Francisco, USA) wurden in DMEM-Medium (Life Technologies Ltd) mit 1 % Glutamat, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % FCS kultiviert. 3×10^5 HEK293-Zellen pro Vertiefung wurden in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät, am folgenden Tag mit DMEM-Medium gewaschen und mit Hilfe der Kalziumphosphatpräzipitations-Methode nach den Instruktionen des Herstellers (CalPhos™ Mammalian Transfection Kit, Clontech Laboratories, Palo Alto, USA) transient transfiziert. Bei diesem Transfektionsverfahren bilden sich Kristalle aus Kalziumphosphat und DNA, welche dann von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden.

Es wurden jeweils 0,2 µg der leeren Expressionsvektoren bzw. der TLR-kodierenden Plasmide zusammen mit jeweils 0,5 µg der ELAM-1-Luciferase-Reporter-Plasmide (zur Bestimmung der NF-κB-Aktivität) und jeweils 0,5 µg des RSV-β-Galaktosidase-Plasmide (zur Normalisierung der Transfektionseffizienz) kotransfiziert. In anderen Experimenten wurden ELAM-1-Luciferase-Reporter und RSV-β-Galaktosidase-Plasmide zusammen mit jeweils 0,1 µg der dnMyD88- oder der dnNIK-kodierenden Plasmide transfiziert. Nach 8 h wurden die Zellen mit DMEM-Medium/10 % FCS gewaschen und über Nacht kultiviert.

2.5.3 Stimulation der HEK293-Zellen

Am folgenden Tag wurden die HEK293-Zellen mit Glykolipiden und LTAs in der Anwesenheit von 2 % FCS stimuliert. Nach 6 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen.

2.5.4 Galaktosidase- und Luciferase-Bestimmung

Die Lysierung der Zelle, die Luciferase-Bestimmung mit dem „Luciferase Reporter Gen Essay“ (Roche Molecular Biochemicals) und die β-Galaktosidase-Bestimmung mit dem

„β-Gal Reporter Gen Essay, chemilumineszenz“ (Roche Molecular Biochemicals) erfolgte nach den Instruktionen der Hersteller. Die erhaltenen Luciferase-Werte wurden zur Normalisierung der Transfektions-Effizienzen durch die β-Galaktosidase-Werte dividiert und als relative Luciferase-Aktivitäten angegeben.

2.6 Versuche mit C3H/HeJ- und C3H/HeN-Mauszellen

2.6.1 Gewinnung von Peritonealexsudatzellen

Peritonealexsudatzellen (PEZ) von C3H/HeJ- und C3H/HeN-Mäusen (Charles River, Sulzbach) wurden mit Thioglycollat aufgereinigt. Hierfür wurde 6-8 Wochen alten Mäusen 2 ml 3 % Thioglycollat-Medium (Sifin, Berlin) intraperitoneal injiziert. Nach 3 Tagen wurde den Tieren 10 ml eiskaltes HBSS (Life Technologies) intraperitoneal injiziert und durch die Aspiration desselben die PEZ gesammelt. Die Zellsuspensionen wurden bei 170xg für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit RPMI1640-Medium resuspendiert. Nach einem identischen zweiten Waschschrift wurden die Zellen in RPMI1640/5 % FCS in einer Dichte von 1×10^6 PEZ je Vertiefung in 12-Loch-Zellkulturplatten ausgesät.

2.6.2 Stimulation, Gewinnung nuklearer Protein und EMSA

Am nächsten Morgen wurden die Zellen in RPMI1640-Medium gewaschen, 3 h in FCS-freiem Medium inkubiert und daraufhin mit *Treponema*-Glykolipiden, LTAs oder *S. minnesota*-LPS (Sigma) stimuliert. Die Stimulation erfolgte in 2 % FCS enthaltendem RPMI1640-Medium für 1h. Die Gewinnung der nukleären Proteine erfolgte, mit Ausnahme geänderter Volumina der Puffer A (75µl) und B (25µl), wie unter 2.3.2. beschrieben. EMSA wurde wie unter 2.3.4. geschildert durchgeführt.

2.7 TNF-α-Bestimmung in RAW264.7-Zellüberständen

2.7.1 Stimulation der RAW264.7-Zellen

RAW264.7-Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^4 je Vertiefung in einer 96-Loch-

Zellkulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit RPMI1640-Medium gewaschen und in Anwesenheit von 2 % nicht hitzeinaktiviertem FCS mit *Treponema*-Glykolipiden oder *E. coli* 0111:B4-LPS stimuliert. In einigen Versuchen wurden die Zellen 1 h vor der Stimulation mit 50 µM des MEK-Inhibitors PD 98059 (Calbiochem) bzw. 10 µM des p38-Inhibitors SB 203580 (Alexis, Läufingen, Schweiz) inkubiert.

2.7.2 mTNF- α ELISA

Die mTNF- α -Konzentrationsmessungen in den RAW264.7-Zellüberständen erfolgte mittels eines Sandwich-ELISA. Hierfür wurden MaxiSorp-ELISA-Platten (Nunc) mit 3 µg/ml anti-mTNF- α -Antikörpern (PharMingen, Heidelberg) in 100 mM Na₃PO₄ (pH 6,0) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurden nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (PBS, 0,05 % Tween20) die freien Protein-Bindungsstellen mit Blockierungspuffer (PBS, 0,05 % Tween20, 10 % FCS) für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Daraufhin folgte, wie auch vor jedem weiteren Schritt, ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer. Nun wurden eine Standardreihe mit mTNF- α (R&D) und die RAW264.7-Zellüberstände in einer 1:7,5-Verdünnung auf die ELISA-Platten aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Bei Raumtemperatur erfolgte die Detektion mit 500 ng/ml Biotin-konjugierten anti-mTNF- α -Antikörpern (PharMingen) für die Dauer von 1 h und darauffolgend mit 1µg/ml Streptavidin-Peroxidase für 1h, jeweils in Blockierungspuffer. Die Substratreaktion erfolgte mit Ortho-Phenyl-Diphosphat (Sigma) als Substrat. Nach dem Abstoppen der Farbreaktion durch 2 M H₂SO₄ wurde die Extinktion mit einem Spektrometer (SpectraFluor Plus, Tecan) gemessen und die jeweilige mTNF- α -Konzentration anhand der Standardkurve ermittelt.

2.7.3 LDH-Bestimmung

Zur Bestimmung der Toxizität der verwendeten Stimuli und Kinasehemmstoffe auf die RAW264.7-Zellen wurden nach dem Stimulationsende die Laktatdehydrogenase (LDH) in den Überständen ermittelt. Hierzu wurde ein Testkit verwendet (Cytotoxicity Detection Kit [LDH], Roche Molecular Biochemicals). 100 µl Überstand wurden mit 100 µl der Testlösung vermischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend

wurde die Farbreaktion mit 50 µl 1 M Salzsäure pro Vertiefung gestoppt und die Farbintensität mittels eines Spektrometers (SpectraFluor Plus, Tecan) bei 492 nm bestimmt. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ anhand der Absorptionsunterschiede der einzelnen Proben.

2.8 Bestimmung der Tyrosinphosphorylierungen der p42/44-Kinase in RAW264.7-Zellysaten

2.8.1 Zellstimulation und Aufreinigung der postmitochondrialen Überstände

RAW264.7-Zellen wurden in einer Dichte von $1,6 \times 10^6$ je Vertiefung in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Am nächsten Tag wurden sie nach dreimaligem Waschen mit RPMI1640 für 3 h in FCS-freiem RPMI1640-Medium inkubiert. Die Stimulation mit *Treponema*-Glykolipiden oder *E. coli* 0111:B4-LPS, in der Anwesenheit von 2 % nicht hitzeinaktiviertem FCS erfolgte für die Dauer von 20 min. Bestimmte Zellproben wurden vor der Stimulation für 1 h mit den Inhibitoren PD 98059 (50 µM) und SB 203580 (10 µM) inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit eiskaltem PBS/1 mM Na_3VO_4 .

Zur Gewinnung der postmitochondrialen Überstände wurden die Zellen mit 150 µl Lysis-puffer (1 % Triton X-100 [Carl Roth, Karlsruhe], 20 mM Tris-HCl [pH 8], 137 mM NaCl, 10 % Glycerol, 1 mM Na_3VO_4 , 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM Phenylmethan-sulfonylflurid, 0,2 mM Leupeptin, 0,15 U/ml Aprotinin) für 15 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden nun abgeschabt, und die Zellsuspension bei 12000xg für 30 min abzentrifugiert. Die Überstände wurden in 1,5-ml-Eppendorfgefäße überführt und ihre Proteinkonzentrationen, wie unter 2.3.2. beschrieben, bestimmt. Die Proben wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.8.2 Elektrophorese und Phospho-p42/44- und p42/44-Western-Blot

Die Bestimmung der Tyrosinphosphorylierungen der p42/44-Kinasen erfolgte mittels Elektrophorese und der Western-Blot-Technik. Für die Elektrophorese wurden 50 µg der postmitochondrialen Überstände in einem Puffer (50 mM Tris-HCl [pH 6,8], 2 % SDS, 0,1 M DTT, 10 % Glycerol, 0,1 % Bromphenolblau) für 5 min bei 95 °C erhitzt und

sodann in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel (Laufpuffer: 25 mM Tris-Base, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS) aufgetrennt. Nun wurde das Gel in einen Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, 0,2 M Glycerol, 20 % Methanol) gelegt. Gleichzeitig wurde eine Hybond-C-Membran (Amersham Pharmacia Biotech) für 1 sec mit Methanol benetzt und ebenfalls in den Transferpuffer getaucht. Nach 10 min wurden das Gel und die Hybond-C-Membran in eine „Blotting“-Apparatur (Hölzel GmbH, Dörfen) gelegt, und die Proteine von dem Gel auf die Membran transferiert.

Es folgte, wie auch vor jedem weiteren Schritt, ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (PBS, 0,1 % Tween20). Nun wurden die freien Proteinbindungsstellen mit Hilfe von Blockierungspuffer (PBS, 0,1 % Tween20, 5 % Trockenmilchpulver [Sigma]) für 1 h blockiert. Die Membran wurde für 3 h mit Kaninchen-anti-pp42/44-Antikörpern (New England Biolabs, Schwalbach) in einer 1:1000-Verdünnung in einem Puffer A (PBS, 0,1 % Tween20, 5 % Rinderserumalbumin [Carl Roth]) inkubiert. Im Anschluß wurde die Membran mit Peroxidase-konjugierten anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern (Biogenes, Berlin) in einer 1:5000-Verdünnung in Puffer A für 90 min inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System (Amersham Pharmacia Biotech) nach den Instruktionen des Herstellers, und ein Hyperfilm-ECL-Film (Amersham Pharmacia Biotech) wurde belichtet.

Nach dem Abwaschen der vorherigen Antikörper in „Stripping“-Puffer (100 mM HSCH₂CH₂OH, 2 % SDS, 62,5 mM Tris-HCl) bei 50 °C für 20 min wurde als Ladekontrolle die p42/44-Kinase semiquantitativ ermittelt. Hierfür wurde ein Western Blot, in Analogie zur pp42/44-Bestimmung, durchgeführt. Ziege-anti-ERK1-Antikörper sowie Ziege-anti-ERK2-Antikörper (Santa Cruz) wurden als erste und Peroxidase-konjugierte-anti-Ziege-IgG-Antikörper (Santa Cruz) als zweite Antikörper verwendet.

2.9 Statistische Auswertung und benutzte Software

Alle gezeigten Versuche, mit Ausnahme des in Abbildung 9 gezeigten Experiments, wurden mehrfach erfolgreich durchgeführt. Die Abbildungen der NF- κ B-Gelshifts und des Western Blots wurden mit dem Programm Adobe Photoshop D1-4.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) bearbeitet. Die gewonnenen Daten aus den ELISA-, Luciferase- und Galaktosidase-Messungen wurden mit dem U-Test von Mann Whitney

untersucht. Aufgezeigt wurden qualitative Unterschiede, nicht jedoch multiple Differenzen. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p < 0,05$) als signifikant betrachtet. Hierfür wurde das Programm SPSS 9.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet. Mittelwerte und Mittelwertabweichungen wurden mit Hilfe des Programms Excel 97 (Microsoft Corp., Redmond, USA) berechnet und graphisch dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Die Induktion von NF- κ B durch *Treponema*-Glykolipide und Lipoteichonsäuren in RAW264.7- und CHO/CD14-Zellen

Zu Beginn wurden die Glykolipide von *T. brennaborensis* (TB) und *T. maltophilum* (TM) sowie die LTAs von *B. subtilis* (BS) und *S. aureus* (SA) auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu induzieren. LPS von *E. coli* diente als Positiv- und ein „Mock“-Extrakt als Negativkontrolle. Die Mausmakrophagen-Zelllinie RAW264.7 wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen Stimuli in der Anwesenheit von 2 % nicht hitzeinaktiviertem FCS für die Dauer von 1 h inkubiert. Anschließend wurden die nukleären Proteine der RAW264.7-Zellen aufgereinigt und mittels NF- κ B-EMSA untersucht.

Beide verwendeten *Treponema*-Glykolipide, beide LTAs sowie LPS zeigten sich als potente Induktoren der NF- κ B-Translokation in RAW264.7-Zellen (Abbildung 4). Der Aktivierungsgrad des Transkriptionsfaktors erhöhte sich mit den eingesetzten Konzentrationen beider Glykolipide, wobei sich TB im Vergleich zu TM als geringfügig potenter erwies. Dem als Kontrolle eingesetzten „Mock“-Extrakt fehlte jegliche stimulatorische Aktivität.

Die stabil mit CD14 transfizierten CHO-Zellen (CHO/CD14) tragen eine TLR-2-Mutation, und es fehlen funktionelle TLR-2-Transkripte (Heine *et al.*, 1999). Hingegen verfügen sie über funktionsfähige TLR-4 Rezeptoren (Lien *et al.*, 1999). Die Rolle von TLR-2 in der NF- κ B-Aktivierung durch *Treponema*-Glykolipide und Lipoteichonsäuren wurde durch den Einsatz dieser TLR-2-negativen Zelllinie untersucht. Die CHO/CD14-Zellen wurden mit identischen Konzentrationen der gleichen Stimuli wie im RAW264.7-Zellversuch inkubiert, und die NF- κ B-spezifischen DNA-Bindungsaktivitäten der nukleären Extrakte wurden mittels EMSA geprüft.

TB und LPS induzierten im Gegensatz zu TM, BS und SA konzentrationsabhängig den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Abbildung. 4). Das Unvermögen der TM-Glykolipide und beider LTAs zur NF- κ B-Aktivierung in diesen Zellen deutet eine TLR-2-Involvierung in die Zellaktivierung durch diese Stimuli an.

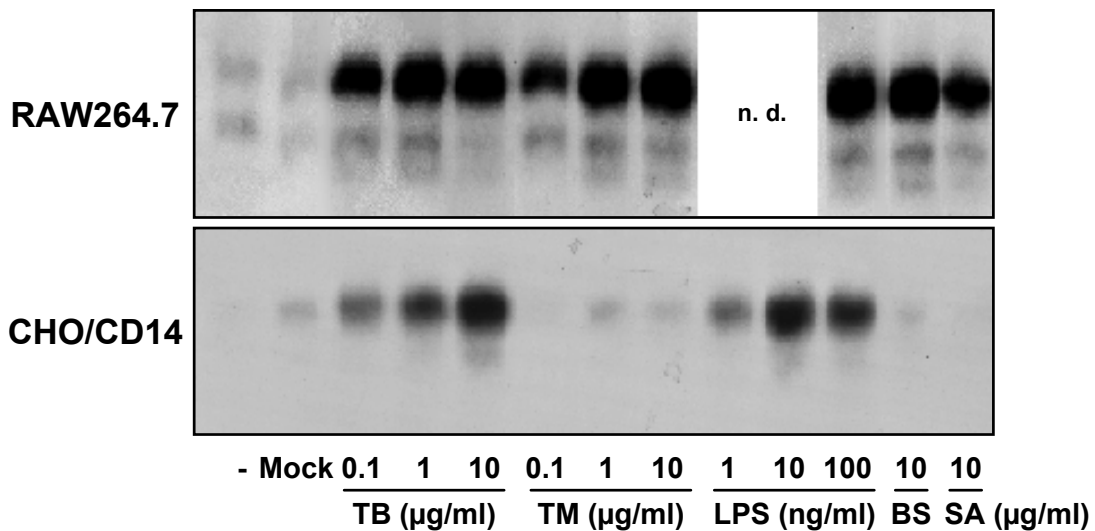


Abbildung 4: Die NF-κB-Induktion durch *Treponema*-Glykolipide und Lipoteichonsäuren in RAW264.7- und CHO/CD14-Zellen

RAW264.7- und CHO/CD14-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Glykolipiden von *T. brennaborensis* (TB) und *T. maltophilum* (TM) sowie LTAs von *B. subtilis* (BS) und *S. aureus* (SA), im Vergleich zu LPS und „Mock“-Extrakt, stimuliert (n. d., nicht durchgeführt). Nach 1 h wurden die nukleären Extrakte aufgereinigt und mit radioaktiv markierten, die NF-κB-Bindungssequenz enthaltenden Oligonukleotiden inkubiert. Die NF-κB-Bindungsaktivitäten wurden mittels EMSA bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

3.1.1 Kompetitions- und Supershift-Analyse

Kompetitions- und Supershift-Experimente wurden zur weiteren Identifizierung der Banden beider vorangegangener Versuche durchgeführt. Die Versuche erfolgten mit nukleären Proteinen unstimulierter sowie LPS-stimulierter RAW264.7- und CHO/CD14-Zellen.

Im Gegensatz zu unspezifischen Oligonukleotiden konnte die unmarkierte, spezifisch NF-κB-bindende DNA die Anlagerung des Transkriptionsfaktors an radioaktiv markierte, spezifische Oligonukleotide verhindern, was für eine Konkurrenz um die Bindung spricht (Abbildung. 5). Diese Konkurrenz weist die spezifische Bindung der nukleären Proteine mit der NF-κB-Sequenz nach.

Die p50-, p52- und p65-erkennenden Antikörper wurden zur Identifizierung der Untereinheiten des Transkriptionsfaktors verwendet. In den RAW264.7-Zellen wurden durch die p50- und p65-Antikörper die Laufeigenschaften der Protein-DNA-Komplexe

verändert. Somit scheinen die *Rel*-Proteine p50 und p65 Hauptbestandteile der NF- κ B-Dimere in diesen Zellen zu sein. In den CHO/CD14-Zellen konnte insbesondere p65 als hauptsächlichster Bestandteil der NF- κ B-Proteine durch „Supershifts“ identifiziert werden.

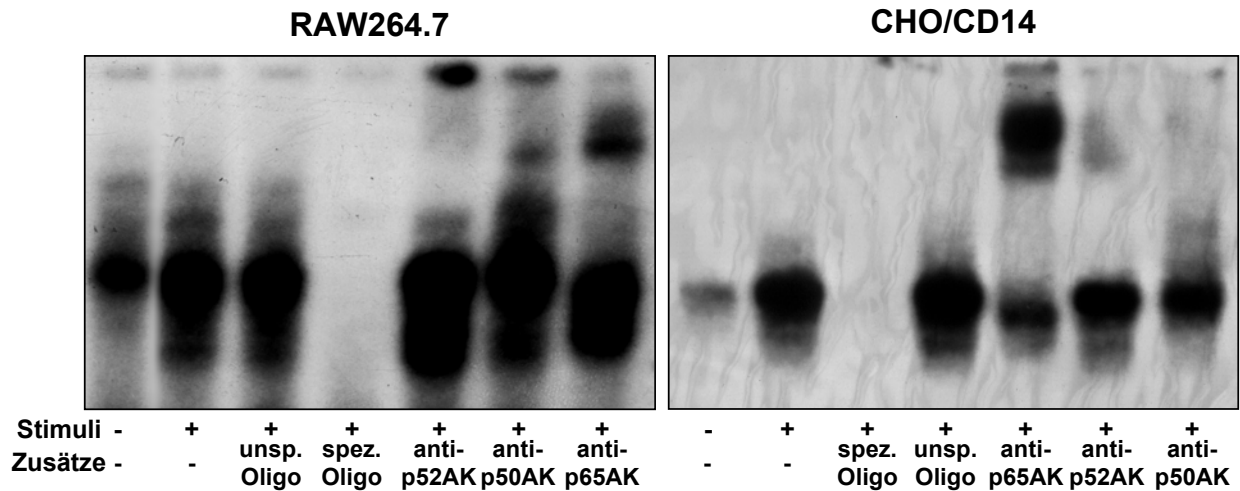


Abbildung 5: Konkurrenz und Supershift-Analyse der DNA-Protein-Komplexe

Nukleäre Extrakte von unstimulierten und stimulierten RAW264.7- und CHO/CD14-Zellen wurden mit radioaktiv markierten, die NF- κ B-Konsensussequenz enthaltenden DNA-Proben inkubiert. Ein Teil der DNA-Protein-Komplexe wurde mit unmarkierten, unspezifischen oder spezifischen Oligonukleotiden, jeweils in 10-fach molarem Überschuß, zur Konkurrenzanalyse inkubiert. Die DNA-Protein-Bindungen ließen sich nur spezifisch kompetitieren. Des Weiteren wurden einigen Proben p50-, p52- oder p65-erkennende Antikörper zur Supershift-Analyse hinzugegeben. Die Bindungen der Antikörper veränderten die Laufeigenschaften der DNA-Protein-Komplexe; Teile der Banden wurden „geshiftet“.

3.2 Die Induktion von hIL-6 in U373MG-Zellen

Um die Rolle von TLR-2 in der Zellaktivierung und insbesondere in der Zytokininduktion durch LTAs und TM weiter zu überprüfen, wurde eine zweite TLR-2-negative, TLR-4-positive Zelllinie -die humane Astrozytom-Zelllinie U373MG- verwendet (Hirschfeld *et al.*, 1999). Diese Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen beider *Treponema*-Glykolipide, beider LTAs sowie von LPS stimuliert, und es wurden die hIL-6-Konzentrationen in den Überständen mittels ELISA bestimmt.

TB und insbesondere LPS waren in der Lage, dosisabhängig hIL-6 zu induzieren (Abbildung 6). Hingegen hatten beide LTAs und die TM-Glykolipide keinen oder nur einen minimalen Effekt auf die IL-6-Sekretion der U373MG-Zellen. Diese Ergebnisse bestätigen die vorherigen Daten der CHO/CD14-Zellexperimente, die für TM und die beiden LTAs eine TLR-2-abhängige Zellstimulation nahelegten.

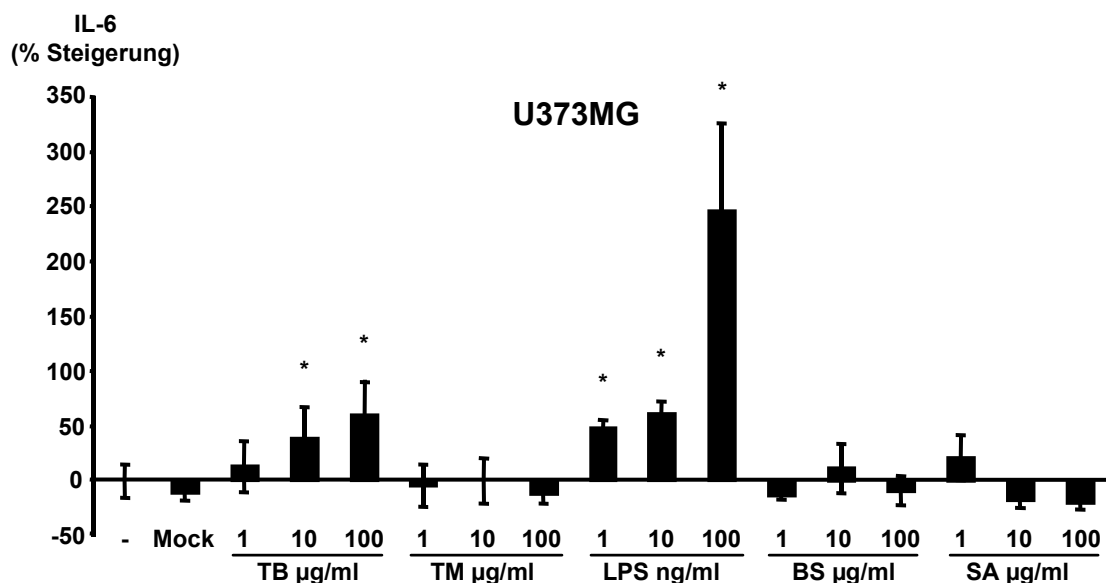


Abbildung 6: Die Induktion von hIL-6 in U373MG-Zellen

U373MG-Zellen wurden über Nacht mit verschiedenen Konzentrationen von *Treponema*-Glykolipiden (TB, TM), LTAs (SA, BS) oder LPS, im Vergleich zum „Mock“-Extrakt stimuliert. Am folgenden Tag wurden die hIL-6-Konzentrationen in den Zellüberständen mit Hilfe eines hIL-6-ELISA ermittelt. Zu sehen sind Mittelwerte und Mittelwertabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten, jeweils mit Vierfach- bzw. Dreifachwerten. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle (-) sind gekennzeichnet (*).

3.3 TLR-Überexpressionen

Die Ergebnisse der TLR-2-negativen Zellsysteme sollten nun durch TLR-Überexpressions-Versuche bestätigt werden. Dazu wurde die embryonale Nierenzelllinie HEK293 verwandt. Diese wurden mit TLR-2-kodierenden Plasmiden bzw. leeren Expressionsvektoren, NF- κ B-abhängigen ELAM-1-Promotor-Luciferase-Reporter-Konstrukten und RSV- β -Galaktosidase-Konstrukten kotransfiziert. Nach einer Ruhephase wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen von TB, TM, BS und SA stimuliert und die relativen Luciferase-Aktivitäten mittels eines Chemilumineszenz-Meßgerätes ermittelt.

Keiner der verwendeten Stimuli aktivierte die mit den leeren Expressionsvektoren transfizierten Zellen (Abbildung 7). Dagegen verursachte die Expression von TLR-2 eine Induzierbarkeit der Luciferase-Aktivitäten durch die verschiedenen bakteriellen Produkte. Die beiden LTAs und -mit Abstrichen- TM, die sich in den vorherigen Experimenten als klare TLR-2 abhängige Stimulanzen erwiesen hatten, zeigten sich in diesem TLR-2-Überexpressions-Versuch als starke Induktoren der Luciferaseaktivität. Die TB-Glykolipide waren hingegen erst in Konzentrationen von 100 μ g/ml in der Lage, die Luciferaseaktivität signifikant zu induzieren. Diese Ergebnisse bestätigen somit erneut die große Bedeutung von TLR-2 in der Zellaktivierung durch die LTAs und TM-Glykolipide sowie die geringere Bedeutung von TLR-2 in der Zellaktivierung durch die TB-Glykolipide.

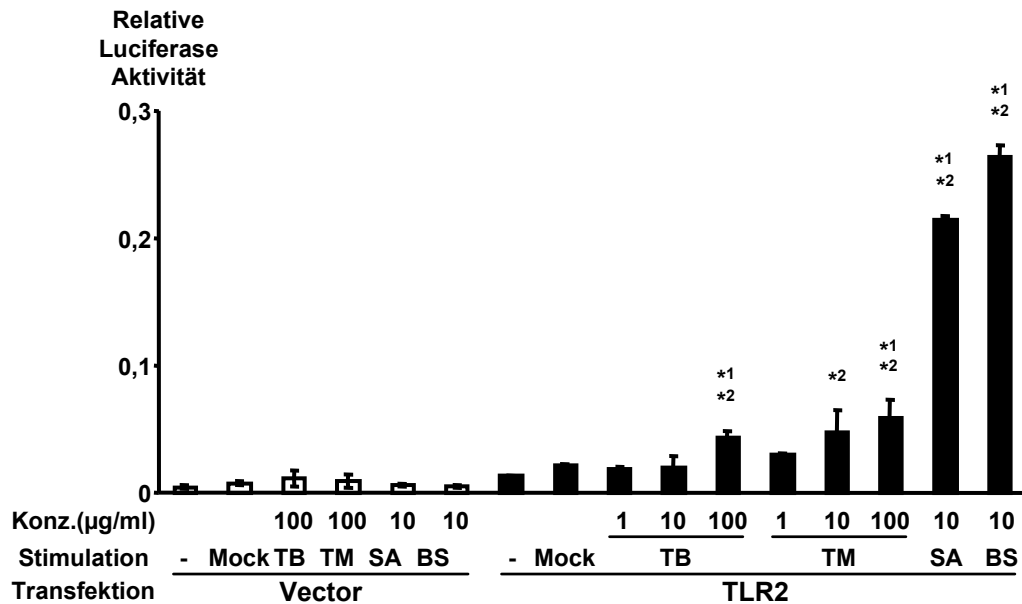


Abbildung 7: Effekt der TLR-2-Überexpression auf die NF-κB-Aktivierung durch *Treponema*-Glykolipide und Lipoteichonsäuren

Die humanen HEK293-Zellen wurden transient mit jeweils 0,2 µg des leeren Expressionsvektors oder des TLR-2-kodierenden Vektors, zusammen mit jeweils 0,5 µg eines NF-κB-abhängigen Luciferase-Reporter-Plasmids und eines β-Galaktosidase-Konstrukts, kotransfiziert. Nach einer Ruhepause wurden die Zellen mit TB, TM, BS und SA in den angegebenen Konzentrationen stimuliert, und die Luciferase- und β-Galaktosidase-Aktivitäten nach weiteren 6 h bestimmt. Relative Luciferase-Aktivitäten wurden nach den Normalisierungen der Luciferase-Werte mit den β-Galaktosidase-Werten ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte und Mittelwertabweichungen von Doppelwerten aus zwei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) gegenüber den nicht mit TLR-2 transfizierten Zellproben (*¹) sowie gegenüber den TLR-2-transfizierten, unstimulierten Zellproben (*²) sind dargestellt. Zwei weitere Versuche wiesen nahezu identische Resultate auf.

3.4 Die Überexpression von dominant-negativen Signaling-Molekülen

Die intrazelluläre Signalkaskade Glykolipid- und LTA-stimulierter Zellen wurde anhand der Überexpression dominant-negativer Mutanten zweier Signaling-Moleküle untersucht. Verwendet wurden Plasmide, welche Mutanten des Adapterproteins MyD88 und der NF-κB-induzierenden Kinase (NIK) kodierten (siehe auch Abbildung 2, Seite 12). Diese DNA wurde in HEK293-Zellen zusätzlich zu TLR-2-, Luciferase- und β-Galaktosidase-Konstrukten, transient transfiziert. Nach der Stimulation der Zellen mit 100 µg/ml

Treponema-Glykolipiden oder 10 µg/ml LTAs wurden die relativen Luciferase-Aktivitäten ermittelt.

In Bestätigung der vorherigen Ergebnisse zeigte sich auch hier eine Stimulation der Zellen durch die verwendeten Stimulanzien (Abbildung 8). Dominant-negative MyD88- und dominant-negative NIK-Mutanten inhibierten jegliche durch TB, TM, BS oder SA induzierte Luciferase-Aktivitäten. Eine entscheidende Rolle von MyD88 und NIK in der durch diese Stimuli induzierten, TLR-2-abhängigen Signaltransduktion wird daher postuliert.

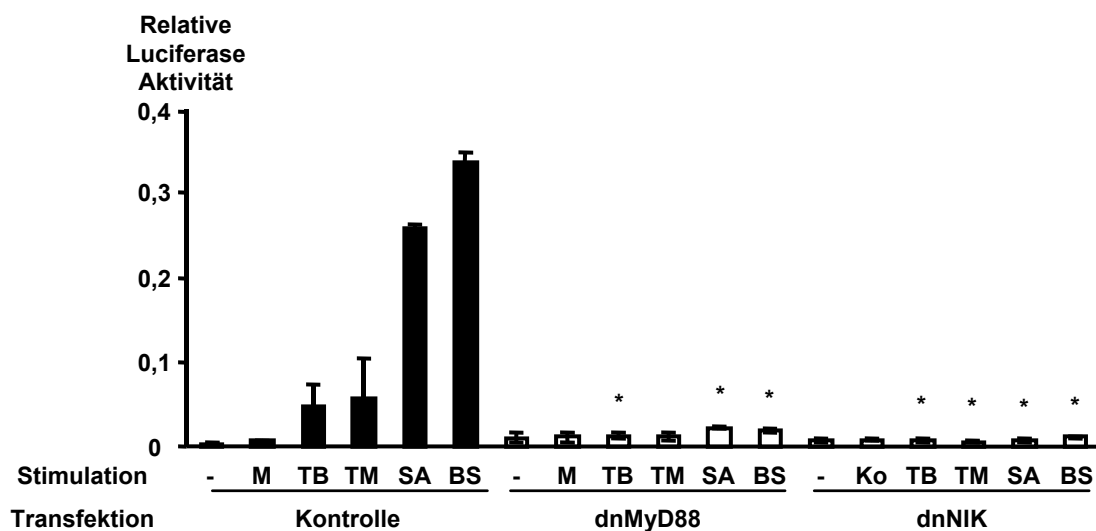


Abbildung 8: Einfluß der Signaling-Moleküle MyD88 und NIK in die *Treponema*-Glykolipid- und LTA-induzierte NF-κB-Aktivierung

HEK293-Zellen wurden transient mit TLR-2-, Luciferase- und β-Galaktosidase-Konstrukten kotransfiziert. Zusätzlich wurden 0,1 µg von dominant-negativen Mutanten der Signaling-Moleküle MyD88 oder NIK transfiziert. Die Zellen wurden mit 100 µg/ml der *Treponema*-Glykolipide oder 10 µg/ml der LTAs stimuliert, und die relative Luciferase-Aktivitäten wurden ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte und Mittelwertabweichungen von jeweils zwei Doppelwerten aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle sind gekennzeichnet (*).

3.5 Die Induktion von NF- κ B durch *Treponema*-Glykolipide und Lipoteichonsäuren in Peritonealexsudatzellen von C3H/HeJ- und C3H/HeN-Mäusen

Die C3H/HeJ-Mäuse tragen im Gegensatz zu C3H/HeN-Mäusen eine Punktmutation im TLR-4-kodierenden Gen, die in einer ausgeprägten LPS-Resistenz resultiert (Poltorak *et al.*, 1998). Peritonealexsudatzellen (PEZ) von Tieren dieser Stämme wurden verwendet, um die Rolle von TLR-4 in der Zellaktivierung durch *Treponema*-Glykolipide und LTAs zu untersuchen. Die PEZ wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen TB, TM, BS, SA und *S. minnesota*-LPS für 1 h inkubiert. Die nukleären Extrakte wurden mittels EMSA auf ihre NF- κ B-Aktivitäten hin untersucht.

TM-Glykolipide führten in Zellen beider Mausstämmen zu vergleichbaren NF- κ B-Induktionen (Abbildung 9). TB hingegen aktivierte die Translokation des Transkriptionsfaktors in C3H/HeN-Zellen in deutlich stärkerem Maße als in C3H/HeJ-Zellen. LTAs von *S. aureus* und *B. subtilis* zeigten sich als starke Induktoren der NF- κ B-Translokation in C3H/HeJ-PEZ. Wie erwartet konnte *S. minnesota*-LPS keine NF- κ B-Aktivität in den PEZ des TLR-4-defizienten Stammes hervorrufen. In diesem Versuch wurde, anders als in den vorherigen Experimenten, *S. minnesota*-LPS verwendet. Dieses LPS zeigte im Vergleich zum *E. coli*-LPS eine stärkere TLR-4-Abhängigkeit (nicht gezeigte Ergebnisse) und wurde deshalb als Kontrolle eingesetzt.

Aufgrund der aufwendigen Versuchsanordnung, welche die Verwendung von speziellen Mausstämmen beinhaltet, und die begrenzte Verfügbarkeit der komplex präparierten Glykolipide wurde diese Experimentalserie, die in Übereinstimmung mit den bisherigen und folgenden Ergebnissen ist, lediglich einmal durchgeführt.

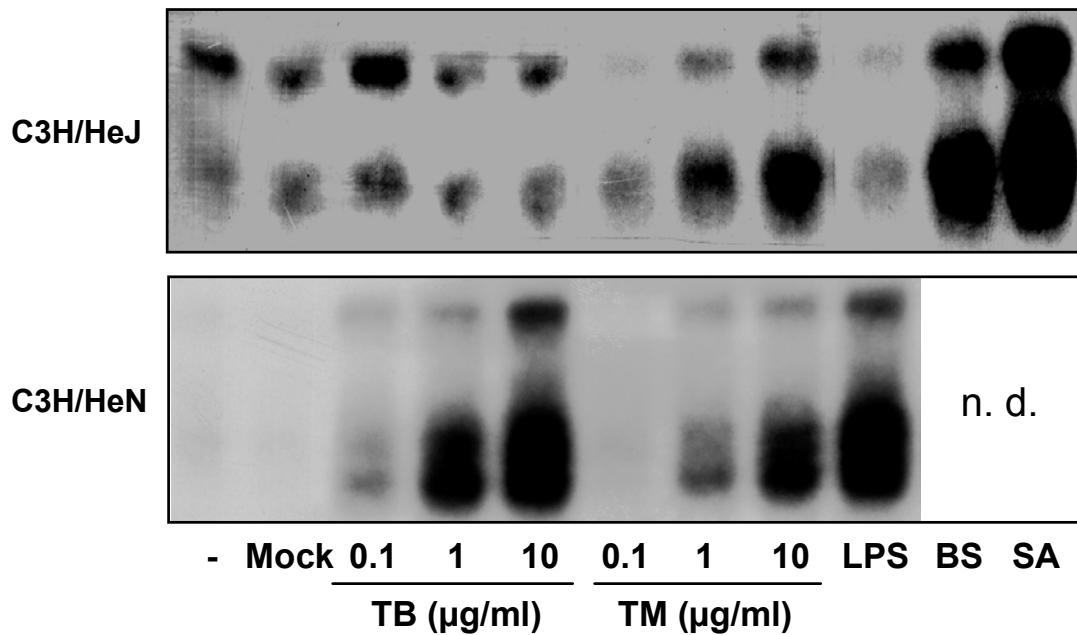


Abbildung 9: Die Glykolipid- und LTA-abhängige Induktion von NF- κ B in PEZ von C3H/HeJ- und C3H/HeN-Mäusen

Peritonealexsudatzellen aus LPS-hyporesponsiblen C3H/HeJ-Mäusen wurden mit den angezeigten Konzentrationen an TB- oder TM-Glykolipiden, mit 10 μ g/ml BS- oder SA-Lipoteichonsäuren oder mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Die NF- κ B-Bindungsaktivitäten in den nukleären Extrakten wurden mittels EMSA ermittelt. Zum Vergleich sind die durch *Treponema*-Glykolipide und LPS induzierten NF- κ B-Bindungsaktivitäten in C3H/HeN-Zellen dargestellt (n. d., nicht durchgeführt).

3.6 Der Einfluß von anti-TLR-4-Antikörpern auf die NF- κ B-Induktion durch *Treponema*-Glykolipide und Lipoteichonsäuren

Um die überraschende Rolle von TLR-4 in der Zellstimulation besonders durch TB weiter zu bestätigen, wurden RAW264.7-Zellen und inhibierende anti-Maus-TLR-4-Antikörper (MTS510) eingesetzt. Die Mausmakrophagen-Zelllinie wurde vor der Stimulation für 1 h mit dem Antikörper inkubiert. Nach der Stimulation mit TB, TM, BS, SA oder *S. minnesota*-LPS wurden die NF- κ B-Aktivitäten in den nukleären Extrakten mittels EMSA ermittelt.

Der Antikörper hemmte die durch LPS und TB induzierten NF- κ B-Translokationen, er hatte jedoch wenig oder keinen Einfluß auf die Stimulationen durch TM, BS und SA

(Abbildung 10). Diese Ergebnisse unterstützen die Beobachtungen des C3H/HeJ-Zellversuches und geben weitere Evidenz für eine TLR-4-Abhängigkeit der TB-vermittelten Zellaktivierung. Die Zellstimulationen durch TM, BS und SA erwiesen sich hingegen als TLR-4-unabhängig.

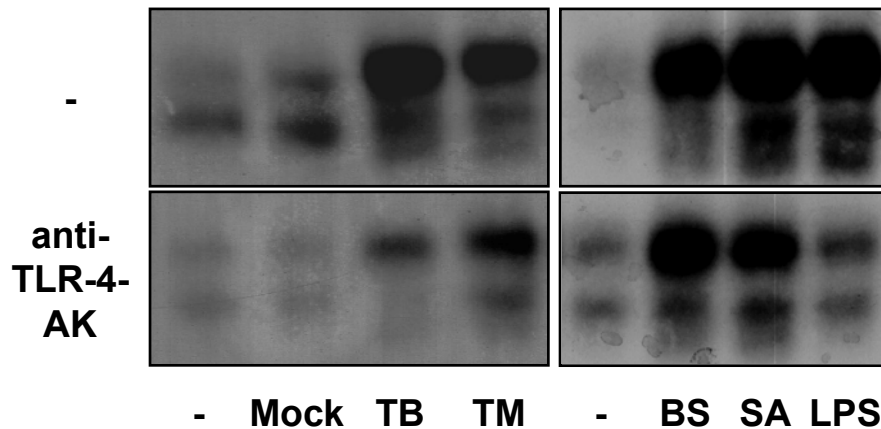


Abbildung 10: Die Effekte eines hemmenden anti-TLR-4-Antikörpers auf die NF- κ B-Translokation

RAW264.7-Zellen wurden für 1 h mit 5 μ g/ml des hemmenden anti-TLR-4-Antikörpers MTS510 inkubiert und anschließend mit jeweils 1 μ g/ml der *Treponema*-Glykolipide (TB oder TM), mit jeweils 0,1 μ g/ml der LTAs (BS oder SA) oder mit 0,1 ng/ml LPS stimuliert. Nach 1 h wurden die nukleären Extrakte aufgereinigt und mit radioaktiv markierten, die NF- κ B-Bindungssequenz enthaltenden Oligonukleotiden inkubiert. Die NF- κ B-Bindungsaktivitäten wurden mittels EMSA bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

3.7 Der Einfluß der MAP-Kinasen p42/44 und p38 auf die TNF- α -Induktion in RAW264.7-Zellen

Der Einfluß der MAP-Kinasen p42/44 und p38 auf die *Treponema*-Glykolipid-induzierte TNF- α -Ausschüttung wurde mit Hilfe von zwei Kinase-Hemmstoffen untersucht. Der MEK-Inhibitor PD98059 beeinflusst indirekt die p42/44-Kinase, da MEK die p42/44-Aktivität reguliert (Alessi *et al.*, 1995). Der Hemmstoff SB203580 reguliert direkt die p38-Kinase (Cuenda *et al.*, 1995). RAW264.7-Zellen wurden für 1 h mit den Inhibitoren (50 μ M PD98059 bzw. 10 μ M SB203580) -einzeln oder in Kombination- inkubiert und darauf folgend für 4 h mit TB, TM oder LPS stimuliert. Nach dieser Zeit wurden die TNF- α -

Konzentrationen in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt.

Beide *Treponema*-Glykolipide sowie LPS induzierten mTNF- α in RAW264.7-Zellen (Fig. 11). Der MEK- und insbesondere der p38-Inhibitor, sowie beide Hemmstoffe in Kombination hemmten die Stimulus-induzierte Zytokinausschüttung.

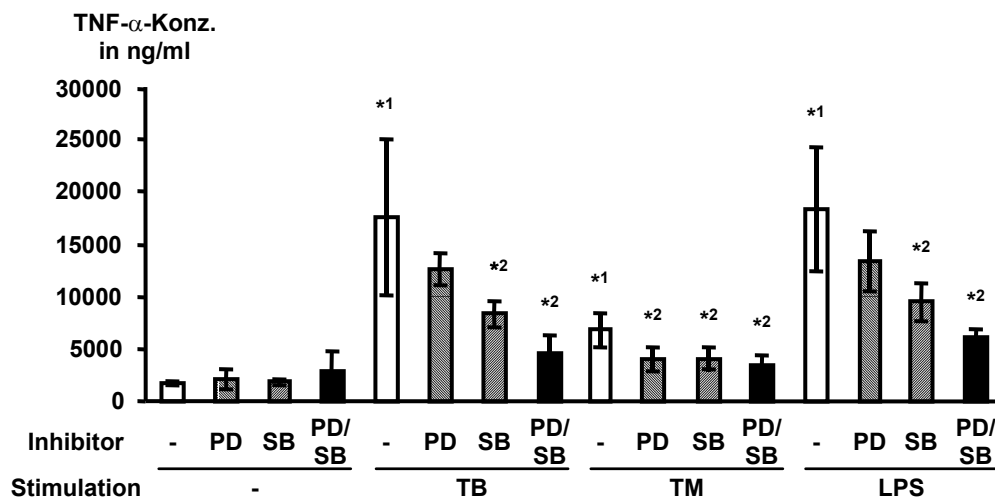


Abbildung 11: Der Einfluß von MEK- und p38-Hemmstoffen auf die *Treponema*-Glykolipid-induzierte mTNF- α -Ausschüttung in RAW264.7-Zellen

RAW264.7-Zellen wurden für 1 h mit RPMI-Medium, mit 50 μ M MEK-Hemmstoff PD98059 (PD), mit 10 μ M p38 MAPK-Hemmstoff SB203580 (SB) oder mit beiden Stoffen gleichzeitig (PD/SB) inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 10 μ g/ml TB, 10 μ g/ml TM oder 10 ng/ml LPS stimuliert. Nach 4 h wurden die mTNF- α -Konzentrationen in den Überständen mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte und Mittelwertabweichungen von Vierfach- oder Doppelwerten aus drei unabhängigen Versuchen. Die Markierung (*¹) kennzeichnet signifikante ($p < 0,05$) Induktionen von TNF- α durch die verwendeten Stimuli; (*²) zeigt signifikante ($p < 0,05$) Hemmungen durch die Inhibitoren an.

Um eine Zelltoxizität der *Treponema*-Glykolipide, von LPS sowie der Kinasehemmstoffe auszuschließen, wurden in den Überständen der RAW264.7-Zellen die LDH-Konzentrationen ermittelt. Leicht erhöhte LDH-Konzentrationen zeigten sich in den Überständen der mit TB, TM oder LPS stimulierten Zellen (Abbildung 12). Bei der Verwendung nur eines Hemmstoffes waren keine zelltoxischen Wirkungen nachzuweisen. Die beobachteten Effekte der Stimulanzen bzw. von PD98059 und

SB203580 auf die mTNF- α -Ausschüttung dürften sich somit kaum mit Zelltoxizität erklären lassen.

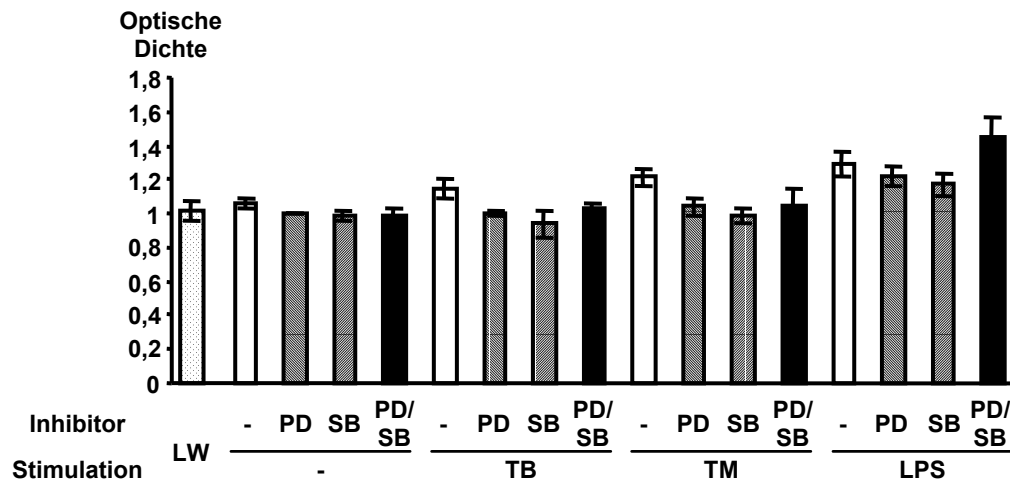


Abbildung 12: LDH-Messung in den RAW264.7-Zellüberständen

Qualitative LDH-Bestimmungen in den Überständen von RAW264.7-Zellen, die mit den Kinaseinhibitoren PD98059 (PD) und SB203580 (SB), den *Treponema*-Glykolipiden (TB und TM) sowie mit LPS inkubiert wurden, erfolgten zum Ausschluß zelltoxischer Effekte. Zum Vergleich ist als Leerwert (LW) die optische Dichte des RPMI1640-Mediums bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Mittelwertabweichungen von Vierfachbestimmungen.

3.8 Der Einfluß von MEK1- und p38-Hemmstoffen auf die Glykolipid-induzierte p42/44-Tyrosinphosphorylierung

Die Beeinflussung der p42/44-Kinaseaktivität durch die *Treponema*-Glykolipide sowie durch MEK1- und p38-Hemmstoffe wurde im folgenden untersucht. Da die Phosphorylierungen und die Aktivitäten der MAP-Kinasen stark korrelieren (Payne *et al.*, 1991), wurden die Tyrosinphosphorylierungen der p42/44-MAP-Kinase bestimmt. Verwendet wurden hierzu RAW264.7-Zellen. Sie wurden mit Medium, 50 μ M PD98059 oder 10 μ M SB203580 für 1 h vorinkubiert und darauffolgend mit *Treponema*-Glykolipiden und LPS für 20 min stimuliert. Die postmitochondrialen Überstände der Zellsate wurden mittels spezifischer Phospho-p42/44-Antikörper und der Western-Blot-Technik auf die Tyrosinphosphorylierungen der p42/44-Kinase hin untersucht. Als Lade-

Kontrolle diente die Detektion der unphosphorylierten p42/44-Kinase.

TB, TM und LPS induzierten die Tyrosinphosphorylierung der p42/44-Kinase (Abbildung 13). Wie erwartet blockierte der MEK1-Hemmstoff die Aktivierung dieser Kinase. In geringerem Maße inhibierte auch der p38-Hemmstoff die Tyrosinphosphorylierung dieser Proteinkinase. Die dargestellte Ladekontrolle zeigte annähernd gleiche Beladungen der Geltaschen an (Abbildung 13).

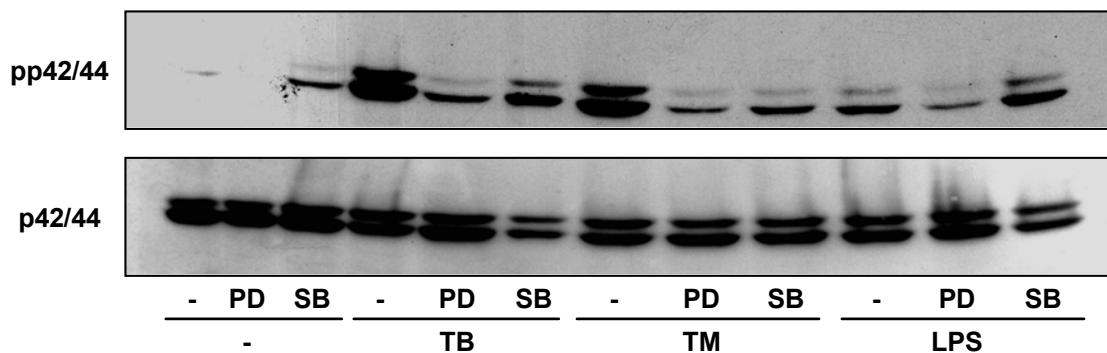


Abbildung 13: Der Einfluß der Kinasehemmstoffe PD98059 und SB203580 auf die Glykolipid- oder LPS-induzierte Phosphorylierungen der p42/44-MAPKs

RAW264.7-Zellen wurden mit RPMI-Medium (-), 50 μ M PD98059 (PD) oder 10 μ M SB203580 (SB) inkubiert und nach 1 h mit 1 μ g/ml TB, 1 μ g/ml TM oder 10 ng/ml LPS stimuliert. Die Zellen wurden nach 20 min lysiert, und die postmitochondrialen Überstände mittels Phospho-p42/44-Western-Blot untersucht. Als Ladekontrolle diente die Detektion der p42/44-Kinase. Ein repräsentativer Versuch von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit fast identischen Resultaten ist dargestellt.

4 Diskussion

Ein wesentlicher Mechanismus der angeborenen Immunität, die Erkennung von hoch konservierten PAMPs durch Wirtszellen, wurde hier untersucht. Während in letzter Zeit große Fortschritte im Verständnis der Körperabwehr auf Gram-negative Bakterien erzielt wurden, blieben wichtige Abläufe der angeborenen Immunantwort auf Gram-positive Bakterien und Treponemen bisher ungeklärt. Der Einfluß von Glykolipiden zweier Treponemen-Spezies und Lipoteichonsäuren zweier Gram-positiver Bakterien auf verschiedene Zellsysteme und die Identifizierung der dafür verantwortlichen Signaltransduzierenden Rezeptoren sowie der intrazellulären Signalkaskaden waren Gegenstand dieser Arbeit.

So konnte die Fähigkeit der untersuchten PAMPs zur Induktion des die inflammatorische Antwort steuernden Transkriptionsfaktors NF- κ B aufgezeigt werden. Eine entscheidende Rolle in der zellulären Erkennung der untersuchten bakteriellen Strukturen konnte Mitgliedern der TLR-Familie zuerkannt werden. TLR-2 wurde als der Signaling-Rezeptor von *B. subtilis*- und *S. aureus*-LTAs identifiziert. Die den LTAs strukturell ähnlichen *Treponema*-Glykolipide stimulierten Zellen über verschiedene *Toll-like*-Rezeptoren. Die Zellaktivierung durch TM-Glykolipide war TLR-2-abhängig. Hingegen konnte für die TB-Glykolipide eine zelluläre Erkennung unter Beteiligung von TLR-4 nachgewiesen werden. An der NF- κ B-Induktion durch die *Treponema*-Glykolipide und die LTAs waren die Signaling-Moleküle MyD88 und NIK beteiligt. Ferner wurde die Bedeutung der MAP-Kinasen p42/44 und p38 in der Zellaktivierung durch Glykolipide und LPS sowie in der TNF- α -Induktion aufgezeigt.

4.1 Die Rolle der *Toll-like*-Rezeptoren

Sowohl TLR-2 als auch TLR-4 wurden als zelluläre LTA-Signaltransduktionsrezeptoren postuliert (Schwandner *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2000). Versuche mit unterschiedlichen TLR-2-negativen Zelllinien, mit anti-TLR-4-Antikörpern, mit Zellen von TLR-4-defizienten C3H/HeJ-Mäusen und die TLR-2-Überexpressions-Experimente identifizierten hier eindeutig TLR-2 als den primären LTA- und TM-erkennenden Signaling-Rezeptor. Im Gegensatz dazu war die TB-induzierte Zellaktivierung

zum Teil TLR-4-abhängig.

Experimente mit HIC-aufgereinigten Fraktionen der TB-Glykolipide zeigten eine TLR-4-Abhängigkeit der hydrophoberen Fraktionen und eine TLR-2-Abhängigkeit der hydrophileren Fraktionen (Opitz *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, daß zwei strukturell unterschiedliche Komponenten die TLR-2 bzw. TLR-4-Bindung verursachen.

Die vorliegenden Ergebnisse, die TLR-2 als den LTA-Rezeptor identifizierten, werden durch veröffentlichte Ergebnisse von TLR-Überexpressions-Versuchen mit kommerziell erworbener LTA und PG bestätigt (Schwandner *et al.*, 1999). Sie widersprechen aber anderen Berichten, die anhand von Experimenten mit TLR-2- und -4-defizienten Mäusen TLR-4 als den LTA-Rezeptor darstellten (Takeuchi *et al.*, 1999). In diesen Versuchen wurden ebenfalls kommerziell erworbene LTAs verwendet, die durch HIC weiter aufgereinigt wurden; eine nennenswerte, LPS-Kontaminationen anzeigende LAL-Aktivität fehlte (Takeuchi *et al.*, 1999). Das Fehlen aktiver LTA-Fraktionen sowie andere Verunreinigungen werden jedoch weiterhin als Ursache für die widersprüchlichen Resultate in Betracht gezogen (Hashimoto *et al.*, 2000). Hashimoto *et al.* zeigten kürzlich, daß nur eine kleine Fraktion der von ihnen benutzten *E. hirae*-LTA zytokininduzierende Aktivität entwickelte und beschrieben diese Aktivität als TLR-2- und -4-abhängig (Hashimoto *et al.*, 2000).

Diese kontroversen Ergebnisse könnten durch die verschiedenen Bakterien-Familien oder durch die unterschiedlichen LTA-Extraktionsmethoden erklärt werden. Die *E. hirae*-LTA und die kommerziell erworbenen LTAs wurden mit der Phenol-Wasser-Methode extrahiert und weiter chromatographisch aufgereinigt (Takeuchi *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu wurden die in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten *B. subtilis*- und *S. aureus*-LTAs mit Butanol extrahiert und dann ebenfalls mittels HIC weiter aufgereinigt. Sie zeigten nahezu keine LAL-Aktivitäten (Morath *et al.*, 2001). Dieses Butanol-Aufreinigungsverfahren wurde im Vergleich zum Phenol-Wasser-Verfahren als deutlich schonender für die LTAs, insbesondere hinsichtlich der Alanin-Substituenten, beschrieben (Morath *et al.*, 2001). Ein möglicher Erklärungsansatz der unterschiedlichen Ergebnisse wäre also der unterschiedliche Gehalt der LTAs an Alanin. Demnach wären die hier vorliegenden Ergebnisse, die mit besonders authentischen LTAs erzielt wurden, möglicherweise aussagekräftiger.

Die TLR-2-Überexpressions-Experimente in HEK293-Zellen wurden in Hinblick auf LPS-Resultate angezweifelt (Hirschfeld *et al.*, 2000). Erste Ergebnisse, die TLR-2 als LPS-Rezeptor postulierten (Kirschning *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998), wurden Kontaminationen in LPS-Präparationen zur Last gelegt. Weitere Aufreinigungen der in diesen Studien verwendeten Lipopolysaccharide führten zum Verlust der stimulatorischen Aktivität in TLR-2-transfizierten HEK293-Zellen (Hirschfeld *et al.*, 2000). Auch konnte die anfänglich in diesem System beobachtete konstitutive Zellaktivierung durch die TLR-4-Überexpression als artifiziell begründet und durch neuere Daten widerlegt werden (Chow *et al.*, 1999). So scheint auch in diesen Zellen TLR-4, insbesondere zusammen mit MD-2, der physiologische LPS-Rezeptor zu sein (Chow *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000).

Andererseits passen die hier dargestellten Ergebnisse aus den HEK293-Zellversuchen weitestgehend zu den in anderen Zellsystemen erzielten: LTAs, die in verschiedenen Experimenten klare TLR-2-Abhängigkeit zeigten, waren in den TLR-2-transfizierten HEK293-Zellen ebenfalls potente Stimuli. Dies trifft für die *Treponema*-Glykolipide grundsätzlich ebenfalls zu. Der TLR-2-Ligand TM induzierte die Luciferase-Aktivitäten in den HEK293-Zellen schon in geringeren Konzentrationen als der TLR-4- und TLR-2-Ligand TB, obwohl TB in RAW264.7-Zellen als potenter erschien.

Die im Vergleich zu beiden LTAs schwächere Induktion der HEK293-Zellen durch TM bleibt jedoch zu diskutieren. Einen möglichen Erklärungsansatz hierfür bietet das Fehlen eines zusätzlich zum TLR-2 benötigten Zelloberflächen-Moleküls, möglicherweise MD-2 (Dziarski *et al.*, 2001). Andererseits könnte die Abwesenheit weiterer TLR-Proteine für die schwache HEK293-Zellaktivierung durch die *Treponema*-Glykolipide verantwortlich gemacht werden. Denkbar wäre, in Analogie zur PG-Erkennung, ein Erkennen der Glykolipide durch mehrere kooperierende TLRs (Ozinsky *et al.*, 2000). So gaben Ozinsky *et al.* Hinweise auf ein Unvermögen von alleinigem TLR-2 zur Signalweiterleitung. Sie postulierten die Notwendigkeit von Partner-TLRs, wie TLR-1 oder -6, für die funktionelle Erkennung durch TLR-2 (Ozinsky *et al.*, 2000). Die Bindung der *Treponema*-Glykolipide an weitere TLRs, insbesondere an TLR-1 und -6, muß deshalb in Betracht gezogen werden.

4.2 Strukturelle Unterschiede von TLR-2- und -4-Liganden

Nehmen wir eine direkte Bindung pathogener Strukturen an Mitglieder der TLR-Familie an, so ist bisher wenig über die strukturellen Voraussetzungen der selektiven Erkennung durch TLR-2 oder -4 bekannt. Viele verschiedene TLR-2-Liganden, wie bakterielle Lipoproteine, mykobakterielle Lipoarabinomannane, ganze Gram-positive Bakterien und Hefen sind bekannt (Aderem and Ulevitch, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde TLR-2 als Signaling-Rezeptor beider LTAs und der TM-Glykolipide identifiziert. Ferner konnte die Bedeutung von TLR-4- und -2 in der Zellaktivierung durch TB-Glykolipide dargestellt werden.

Lebende *M. tuberculosis* Bakterien verhielten sich bezüglich der TLR-Benutzung den TB-Glykolipiden ähnlich. Sie waren in der Lage, Wirtszellen über TLR-2 oder TLR-4 zu stimulieren, wohingegen die eng verwandten *M. avium* nur TLR-2 aktivierten (Means *et al.*, 1999). Im Fall von *M. tuberculosis* schienen hitzeinstabile zellassozierte Faktoren, wahrscheinlich Proteine, für die TLR-4-Abhängigkeit verantwortlich zu sein. Durch Hitze abgetötete Mykobakterien stimulierten Zellen TLR-4-unabhängig (Means *et al.*, 1999). Im Falle der *Treponema*-Glykolipide scheinen jedoch andere Molekülstrukturen für die TLR-4-Benutzung verantwortlich: Bei der Aufreinigung der Glykolipide wurden die Zellsuspensionen bei 68°C in der Anwesenheit von Phenol erhitzt und mit Proteinase behandelt, ohne einen Verlust der Aktivität zu bewirken (Schröder *et al.*, 2000).

Lipoproteine aus *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum* und *Mycoplasma fermentans* aktivieren Immunzellen über TLRs (Lien *et al.*, 1999). Der Anteil der Fettsäuren schien dabei die Aktivierung von TLR-2 zu beeinflussen. Ein amphiphiler Charakter der Moleküle mit einem hohen Anteil an Fettsäuren wurde als Voraussetzung für die TLR-2-Erkennung angenommen (Lien *et al.*, 1999). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese finden sich in beiden hier untersuchten LTAs und in den TM-Glykolipiden höhere Anteile an Fettsäuren und weniger Kohlenwasserstoffe als in den TB-Glykolipiden (siehe Tabelle 1 und [Schröder *et al.*, 2000]). Andererseits erwiesen sich die in der HIC aufgetrennten hydrophileren Fraktionen von TB als TLR-2-Liganden; die hydrophoberen Fraktionen von TB waren indes TLR-4-Liganden (Opitz *et al.*, 2001).

Zu klären bleibt, ob Unterschiede im Lipidanker zur Erkennung des TB-Glykolipids durch TLR-4 beitragen. Ferner könnten Unterschiede bezüglich des Alanin-Gehalts der

untersuchten PAMPs - TM, SA und BS enthielten die Aminosäure, in TB wurde sie nicht gefunden - für die unterschiedliche Effekte auf TLR-2 und -4 verantwortlich sein (Iwasaki *et al.*, 1989; Schröder *et al.*, 2000; Morath *et al.*, 2001). Die LTAs von *B. subtilis* und *S. aureus* wurden mit Butanol aufgereinigt, die *Treponema*-Glykolipide hingegen mittels einer Phenol-Wasser-Extraktion. Ein Alanin-Verlust der TB-Glykolipide durch das Extraktionsverfahren ist nicht auszuschließen, erscheint jedoch aufgrund des nachgewiesenen Alanin-Gehalts von TM als wenig wahrscheinlich (Schröder *et al.*, 2000). Nichtsdestotrotz wäre eine Butanol-Aufreinigung der *Treponema*-Glykolipide und ein nachfolgender Vergleich der unterschiedlich extrahierten Glykolipide für die Zukunft empfehlenswert.

Tabelle 1. Vergleich der *Treponema*-Glykolipide und der LTAs

Charakteristika	<i>T. brennaborensis</i>	<i>T. maltophilum</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
Fettsäuregehalt	2.8 %	8.3 %	~10 %	~10 %
Einheiten der Kette	30-40 Einheiten von jeweils ~5 Zuckern	~5 Einheiten von jeweils ~20-30 Zuckern	~25-35 Glycerophosphate	45-50 Glycerophosphate
NF-κB in RAW	+++	+++	+++	++
NF-κB in CHO/CD14	++	-	-	-
IL-6 in U373MG	++	-	-	-
NF-κB-Luc in HEK/TLR-2	+	++	+++	+++
NF-κB in C3H/HeN	+++	++	n. d. ‡	n. d. ‡
NF-κB in C3H/HeJ	+	++	+++	++
NF-κB in RAW/anti-TLR-4-AK	+	+++	+++	++

Tabelle 1: Vergleich der Struktur und biologischen Aktivität von *Treponema*-Glykolipiden und Lipoteichonsäuren

†Chemische Analysen der *Treponema*-Glykolipide (Schröder *et al.*, 2000), Daten der *B. subtilis*- und *S. aureus*-LTAs (Iwasaki *et al.*, 1989; Polotsky *et al.*, 1996; Morath *et al.*, 2001); ‡n. d., nicht durchgeführt

4.3 Die intrazelluläre Signaltransduktion

In der vorliegenden Studie konnte ein durch die *Treponema*-Glykolipide und beide LTAs induzierter Signalweg, unter Einbeziehung der TLRs, des Adapterproteins MyD88, der Kinase NIK und des Transkriptionsfaktors NF- κ B skizziert werden. NF- κ B spielt eine Schlüsselrolle in der Aktivierung von Immunzellen (Zhang and Ghosh, 2001). Die beiden *Rel*-Proteine p50 und p65 konnten in den durch die Glykolipide und LTAs induzierten NF- κ B-Dimeren der RAW264.7-Zellen und p65 in den CHO/CD14-Zellen identifiziert werden. Heterodimere aus p50 und p65 sowie p65-Homodimere sind als transkriptionell aktiv beschrieben worden (Karin and Ben-Neriah, 2000). Der p50/p65-Heterodimer stellt die am häufigsten beobachtete Form des NF- κ B-Proteins dar (Karin and Ben-Neriah, 2000). Dieser Transkriptionsfaktor ist an der Induktion vieler für die Immunantwort essentieller Zytokine, wie etwa IL-6 oder TNF- α beteiligt (Ghosh *et al.*, 1998). Die Fähigkeit zur Aktivierung von NF- κ B konnte schon für viele andere PAMPs, wie beispielsweise LPS, Lipoproteine und Peptidoglykane, aufgezeigt werden (Muller *et al.*, 1993; Gupta *et al.*, 1996; Norgard *et al.*, 1996). Störungen der NF- κ B-Regulationen wurden mit vielen Krankheiten, wie Tumoren, neurodegenerativen Erkrankungen, Arthritis, entzündlichen Darmerkrankungen und Asthma, in Verbindung gebracht (Karin and Ben-Neriah, 2000).

Des Weiteren wurde hier, in Ergänzung anderer Daten unseres Labors (Schröder *et al.*, 2001), die Rolle der MAP-Kinasen in der Zellstimulation durch *Treponema*-Glykolipide dargestellt. Beide Glykolipide induzierten die Phosphorylierung der p42/44 MAPKs. Hemmstoffe der p38- und der p42/44-MAPK-Kaskaden inhibierten die durch TB, TM oder LPS induzierte TNF- α -Ausschüttung. Diese Ergebnisse ergänzen und bestätigen veröffentlichte Ergebnisse über den Einfluß der p42/44-Kinase in der TNF- α -Induktion durch LPS (Tsai *et al.*, 2000). Die vorliegenden Resultate sind aber hinsichtlich der Beteiligung der p38-Kinase widersprüchlich zu kürzlich publizierten Ergebnisse anderer (Tsai *et al.*, 2000). Tsai *et al.* verwendeten ebenfalls den Hemmstoff SB203580: dieser hatte jedoch keinen Einfluß auf die LPS-induzierten TNF- α -mRNA-Spiegel (Tsai *et al.*, 2000).

Im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen ist eine andere aktuelle Studie, die eine Beeinflussung der LPS-stimulierten Zytokinausschüttung durch p38- und p42/44-

Hemmstoffe auf der Ebene der Transkription nahelegt (Rutault *et al.*, 2001). Diese Veröffentlichung berichtete ferner über eine Destabilisierung des TNF- α -Transkripts durch die p38-Blockierung. Somit kann trotz weiter bestehendem Klärungsbedarf hinsichtlich der genauen Mechanismen eine TNF- α -Induktion durch die *Treponema*-Glykolipide, unter Beteiligung der p38- und p42/44-Kinasen als gesichert gelten.

Ein Einfluß von TLR-4 auf die Aktivierung der p42/44 MAPK wurde kürzlich in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen (Schröder *et al.*, 2001). Es konnte die Hemmung der *Treponema*-Glykolipid- und LPS-induzierten MAPK-Aktivität durch den inhibierenden anti-TLR-4-Antikörper MTS510 in RAW264.7-Zellen gezeigt werden. Andererseits wurde in den TLR-2-negativen U373MG-Zellen eine MAPK-Aktivierung durch TM-Glykolipide beobachtet (Schröder *et al.*, 2001), die sich in der Induktion von NF- κ B und IL-6 klar TLR-2-abhängig verhielten. Über die Ursachen dieses scheinbaren Widerspruches kann bis jetzt nur spekuliert werden. Mögliche Erklärungsansätze bieten zum Beispiel unterschiedliche Stimulationszeiten. Auch die Stimulierung über weitere, funktionell mit den MAPK-Kaskaden verbundene Rezeptoren - wie beispielsweise TLR-1 oder -6 - erscheint denkbar. Diese Hypothese setzt unterschiedliche, durch verschiedenen TLRs induzierte Signalkaskaden voraus. TLR-1 oder -6 könnten zur MAPK-Aktivierung beitragen, hätten jedoch wenig Einfluß auf die IL-6-Induktion.

Die möglicherweise unterschiedliche Beeinflussung der MAP-Kinasen durch verschiedene TLRs könnten als Hinweise auf Differenzen in den durch die TLRs initiierten Signalkaskaden gewertet werden. In *Drosophila* werden durch Pilzsporen (über *dToll*) bzw. durch Gram-negative Bakterien (über ein *Toll*-homologes Protein, eventuell *18-wheeler*) unterschiedliche Kaskaden initiiert und Proteine exprimiert (Lemaitre *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1997; Rutschmann *et al.*, 2000). Somit erscheinen auch im Säugetier Unterschiede in den durch die verschiedenen TLRs ausgelösten zellulären Aktivitäten nicht unwahrscheinlich. Neueste Ergebnisse deuten Divergenzen in den durch TLR-1, -2, -4 und -6 initiierten Signalkaskaden an (Arbibe *et al.*, 2000; Ozinsky *et al.*, 2000; Hirschfeld *et al.*, 2001). Ein Signalweg unter Beteiligung der PI3-Kinase konnte für TLR-2 gezeigt werden (Arbibe *et al.*, 2000). Es wurden Unterschiede in den zytosolischen Domänen verschiedener TLRs bezüglich einer PI3-Kinase-Bindungsstelle gefunden (Arbibe *et al.*, 2000). Diese Differenzen deuteten eine nur manchen TLR-Familien-

mitgliedern vorbehaltene Fähigkeit an, diese Kaskade zu initiieren.

In der vorliegenden Arbeit konnten annähernd gleiche Aktivierungsmuster von NF- κ B und der p42/44-MAPK durch TB und TM gezeigt werden. Im Gegensatz dazu unterschieden sich beide Glykolipide in der Fähigkeit TNF- α zu induzieren. Diese Beobachtungen könnten als Hinweise auf Differenzen der TLR-2- bzw. TLR-4-initiierten Signalkaskaden gewertet werden.

Unterschiede in der TLR-4-vermittelten Aktivierung von NF- κ B und der MAPKs wurden beschrieben. Mit TLR-4 transfizierte HEK293-Zellen reagierten auf die LPS-Stimulation mit der Translokation von NF- κ B, nicht jedoch mit der Aktivierung von MAP-Kinasen (Yang *et al.*, 2000). Die zusätzliche Überexpression von MD-2 resultierte in der Aktivierbarkeit der MAPKs (Yang *et al.*, 2000).

Hinweise auf die Existenz von weiteren auf bakterielle PAMPs reagierenden Molekülen neben den TLRs boten Versuche mit MyD88-KO-Mäusen (Kawai *et al.*, 1999). Kawai *et al.* berichteten einerseits über eine LPS-Resistenz dieser KO-Mäuse und über ein Fehlen der TNF- α -, IL-6- und Stickstoffmonoxid-Induktion in PEZ dieser Mäuse durch LPS (Kawai *et al.*, 1999). Andererseits war eine (leicht verzögerte) p42/44-, p38- sowie JNK-Aktivierung und eine NF- κ B-Translokation durch LPS in diesen MyD88-KO-Zellen zu beobachten (Kawai *et al.*, 1999). Des Weiteren wurde von verzögerten bzw. erst durch höhere LPS-Konzentrationen induzierten NF- κ B-Translokationen in Zellen der LPS-hyporesponsiven C3H/HeJ-Mäusen berichtet (Ding *et al.*, 1995). Hingegen zeigten Versuche mit *Mycoplasma*-Lipoproteinen in Peritonealexsudatzellen von MyD88- und TLR-2-KO-Mäusen ein Fehlen der NF- κ B-Translokation und JNK-Aktivierung durch diese Stimuli (Takeuchi *et al.*, 2000b).

Diese Ergebnisse sprechen für die TLRs als hauptsächliche PAMP-erkennende Signaling-Rezeptoren; sie legen jedoch ferner die Existenz weiterer auf bakterielle Strukturen reagierender Moleküle der Zellen nahe. Ein möglicher Kandidat dafür wäre der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor A (SR-A). Mit LPS behandelte SR-A-KO-Mäuse zeigten im Vergleich zu Wild-Typ-Stämmen normale TNF- α -Serumspiegel, jedoch abgeschwächte IL-1 β -Spiegel (Kobayashi *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse deuten auf eine SR-A-Abhängigkeit der IL-1 β -Induktion in Makrophagen und damit auf eine Rolle von SR-A in der Aktivierung dieser Zellen hin. Das Fehlen einer Zellaktivierung durch

Mycoplasma-Lipoproteine in TLR-2- und MyD88-defizienten Zellen wäre nach dieser These durch ein fehlendes Erkennen durch weitere, von TLR-2 verschiedene Rezeptoren zu erklären.

Verbindungen zwischen der TLR-IRAK-NF- κ B-Kaskade und den MAPK-Kaskaden wurden auf der Ebene von IL-1/TLR-Signaling-Molekülen gefunden. Eine Überexpression von TRAF6 resultierte in der Aktivierung der JNK-Kinase (Song *et al.*, 1997). Ferner war in Fibroblasten von IRAK-KO-Mäusen die Aktivierung von NF- κ B, p38 und JNK durch IL-1 im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen stark reduziert (Kanakaraj *et al.*, 1998).

Inzwischen sind erste die beiden Kaskaden verbindende Proteine identifiziert worden: (1) Das Adapterprotein ECSIT scheint TRAF6 mit der Kinase MEKK-1 zu verbinden, welche wiederum den IKK-Komplex, bzw. über MEKs die MAP-Kinasen JNK, p38 und p42/44 aktivieren kann (Kopp *et al.*, 1999). (2) Die Adapterproteine TAB1 und TAB2 verbinden TRAF6 mit der Kinase TAK. TAK scheint als NIK-aktivierendes Enzym eine wichtige Rolle im NF- κ B-Signalweg zu spielen und ist zudem in der Lage, die Kinasen JNK und p38 zu aktivieren (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999; Zhang and Ghosh, 2001). (3) Die Kinase COT/TLP-2 wurde sowohl mit der NF- κ B-Aktivierung (Belich *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1999) als auch mit der Aktivierung der p42/44- und JNK-Signalwege in Verbindung gebracht (Salmeron *et al.*, 1996).

Ein weiteres Zusammenspiel der MAPK- und der NF- κ B-Kaskaden scheint auf der Ebene von NF- κ B selbst stattzufinden. Eine Modulation des Aktivierungspotenzials, nicht aber der DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch p42/44, p38 und JNK, wird angenommen (Vanden Berghe *et al.*, 1998; Tuyt *et al.*, 1999).

4.4 Die Bedeutung verschiedener mikrobieller Strukturen und der TLRs in Infektionen durch Gram-positive Bakterien und Treponemen

Die entscheidende Komponente Gram-negativer Bakterien in der Induktion der angeborenen Immunantwort ist das in der äußeren Membran verankerte LPS. Dieses Makromolekül spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Pathogenese des durch Gram-negative Bakterien ausgelösten septischen Schocks (Ulevitch and Tobias, 1999). Die Mechanismen, mit denen Gram-positive Bakterien Entzündungsantworten hervorrufen,

sind noch unzureichend geklärt. Die Zellwände Gram-positiver Bakterien enthalten LTAs, Peptidoglykane und Lipoproteine, die, ähnlich wie LPS, Leukozyten aktivieren und Zytokine induzieren (Kengatharan *et al.*, 1998).

Es wurde gezeigt, daß LTAs und PGs synergistisch in der Induktion von TNF- α , IFN- γ und NO sowie in der Verursachung des septischen Schocks und des Organversagens in Ratten zusammenwirken (De Kimpe *et al.*, 1995). Hierbei schien die Fähigkeit Gram-positiver Bakterien zur NO-Induktion sowie möglicherweise auch ihre Pathogenität durch die Struktur der LTA bestimmt zu sein (Kengatharan *et al.*, 1998). *S. aureus*-LTA, nicht jedoch *B. subtilis*-LTA, konnte synergistisch mit den PGs beider Bakterien in der Induktion von NO zusammenwirken. Diese Ergebnisse deuteten auf eine entscheidende Rolle der LTAs hin und postulieren eine nur verstärkende Funktion von PG in der Immunstimulation (Kengatharan *et al.*, 1998). Die sehr ähnliche Struktur beider LTAs unterschied sich nach den veröffentlichten Ergebnissen der chemischen Analyse lediglich in der Glykolisierung der Ketten und im Anteil der Alaninsubstitutionen (Kengatharan *et al.*, 1998). Die in der Studie beobachtete schwächere Potenz der BS-LTA (Kengatharan *et al.*, 1998) steht im Widerspruch zu den Resultaten der hier vorliegenden Arbeit. Die Diskrepanz könnte durch die verwendeten unterschiedlichen LTA-Extraktionsverfahren zu erklären sein. Bestätigende Hinweise auf ein synergistisches Zusammenwirken von PG und LTA in der Pathogenese der Sepsis ergaben *in vivo*-Versuche in Ferkeln (Middelveld and Alving, 2000).

Die Rolle von TLR-2 in der PG- und der Lipoprotein-Erkennung ist bekannt (Aliprantis *et al.*, 1999; Brightbill *et al.*, 1999; Schwandner *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 1999; Ozinsky *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde TLR-2 als LTA-Rezeptor identifiziert. Aufgrund der Bedeutung der bakteriellen Zellwandkomponenten während der Infektion durch Gram-positive Bakterien war die kürzlich gefundene erhöhte Mortalität von TLR-2- und MyD88-KO-Mäusen bei *S. aureus*-Infektionen nicht überraschend (Takeuchi *et al.*, 2000a). Erstaunlich an diesen Ergebnissen erschien vielmehr die zwar abgeschwächte, jedoch nicht aufgehobene Fähigkeit der TLR-2-defizienten Makrophagen, Zytokine als Antwort auf Hitze-getötete *S. aureus* zu produzieren. Im Gegensatz dazu waren MyD88-defiziente Makrophagen hierzu nicht in der Lage (Takeuchi *et al.*, 2000a).

Diese Daten deuten auf TLR-2 als Hauptrezeptor von *S. aureus* hin; sie implizieren

jedoch zudem weitere, von TLR-2 verschiedene, mitbeteiligte zelluläre Moleküle. Für weitere an der Erkennung ganzer Gram-positiver Bakterien beteiligte Rezeptoren sprechen auch Versuche mit abgetöteten Streptokokken der B-Gruppe (Flo *et al.*, 2000).

Kürzlich wurde ein Polymorphismus im TLR-2-Gen des Menschen entdeckt (Lorenz *et al.*, 2000). Eine Korrelation zwischen dem Auftreten der TLR-2-Mutation und der Prävalenz der Gram-positiven Sepsis wurde angenommen, konnte jedoch aufgrund zu geringer Fallzahlen statistisch noch nicht bewiesen werden (Lorenz *et al.*, 2000).

Wenig ist bisher über die molekularen Mechanismen der angeborenen Immunantwort auf Spirocheten bekannt. Die Anwesenheit von LPS in Spirocheten wurde lange kontrovers diskutiert; die Analyse des Genoms von *T. pallidum* zeigte jedoch ein Fehlen von LPS-Genen (Schröder *et al.*, 2001). Lebende *B. burgdorferi* und *T. pallidum* aktivierten Immunzellen (Defosse and Johnson, 1992; Riley *et al.*, 1992). Das Unvermögen lebender *B. burgdorferi*, CHO/CD14-Zellen zu stimulieren, läßt eine TLR-2-Abhängigkeit der Zellaktivierung vermuten (Sellati *et al.*, 1999). Berichtet wurde ferner über eine TLR-2-abhängige Zellstimulation durch Lipoproteine von *B. burgdorferi* und *T. pallidum* (Hirschfeld *et al.*, 1999; Lien *et al.*, 1999).

Untersuchungen mit *T. denticola* führten dazu, daß Membran-assoziierte Lipoproteine und Lipooligosaccharide als hauptsächliche Immunstimulatoren identifiziert wurden (Rosen *et al.*, 1999). Eine TLR-4-unabhängige Zellstimulation könnte angenommen werden, da beide Membrankomponenten Makrophagen der LPS-hyporesponsiven C3H/HeJ-Maus aktivierten (Rosen *et al.*, 1999). Schultz *et al.* identifizierten ein Membran-assoziiertes Lipid von *T. denticola* mit großer Ähnlichkeit zu den von Rosen *et al.* beschriebenen Lipooligosacchariden sowie mit starker Übereinstimmung zu den Glykolipiden von TB und TM (Schultz *et al.*, 1998; Ishihara and Okuda, 1999; Rosen *et al.*, 1999; Schröder *et al.*, 2000). Dieses von Schulz *et al.* beschriebene Lipid der äußeren Membran von *T. denticola* ähnelt, wie auch die TB- und TM-Glykolipide, den LTAs Gram-positiver Bakterien.

Demnach enthalten *T. denticola*, *T. maltophilum* und *T. brennaborensis* biologisch wie chemisch verwandte Moleküle. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, im Einklang mit vorherigen Studien unseres Labors, daß TM- und TB-Glykolipide Makrophagen und andere Zellen zur Induktion proinflammatorischer Zytokine stimulieren (Schröder *et al.*, 2000; Schröder *et al.*, 2001). Diese Zellaktivierung erfolgt in Abhängigkeit von TLR-2

bzw. TLR-2 und -4.

Nach dem derzeitigen Wissensstand ist anzunehmen, daß verschiedene Moleküle der Spirocheten eine Immunantwort hervorrufen. Die genauere Untersuchung der jeweiligen Relevanz für die Interaktion mit dem Immunsystem sollte Inhalt weiterer Versuche sein. Vorläufige Ergebnisse aus Zellstimulationsexperimenten mit ganzen *Treponemen*-Zellen deuten eine im Vergleich zu den Glykolipiden ähnliche TLR-Involvierung an. So scheint die Zellaktivierung durch ganze TB-Zellen ebenfalls TLR-4-abhängig (Opitz *et al.*, 2001).

Zusammenfassend läßt sich von einer herausragenden Bedeutung von TLR-2 für die Immunantwort auf Gram-positive Bakterien sowie auf Spirocheten sprechen. In Abhängigkeit von den jeweiligen mikrobiellen Strukturen erscheinen weitere Rezeptoren, wie beispielsweise TLR-4, beteiligt.

4.5 Schlußfolgerungen und Ausblick

Durch die hier durchgeführten *in vitro*-Versuche konnte ein wichtiger Mechanismus der angeborenen Immunantwort, die Erkennung von Gram-positiven Bakterien und *Treponemen* durch Zellen des Immunsystems, weiter aufgeklärt werden. Die Bedeutung der *Toll-like*-Rezeptoren, insbesondere von TLR-2 als Signaling-Rezeptor der LTAs sowie von TLR-2 und -4 in der Erkennung der *Treponema*-Glykolipide, wurde aufgezeigt. Die hierfür verwendeten Zellsysteme von unterschiedlichen Spezies erbrachten sich gegenseitig bestätigende Ergebnisse.

Weiterführende *in vivo*-Versuche, beispielsweise mit TLR-2- und TLR-4-KO-Mäusen, bleiben jedoch zur genaueren Aufklärung erforderlich. Des Weiteren sind Butanol-Extraktionen der *Treponema*-Glykolipide und die weitere Durchführung von Experimenten mit intakten *Treponemen*zellen geplant. Diese sollen über die Bedeutung der Glykolipide versus der Lipoproteine in der Aktivierung der Immunzellen weiteren Aufschluß geben. Da Lipoproteine als TLR-2-Liganden gelten, würde eine TLR-4-abhängige Zellstimulation durch ganze TB-Zellen auf eine wichtige Bedeutung der Glykolipide in der Wirtszellaktivierung hindeuten.

Die TLR-2-Überexpressions-Versuche ergaben Hinweise auf eine Beteiligung weiterer

Zellrezeptoren bzw. kooperierender Proteine in der Erkennung der *Treponema*-Glykolipide. Im Hinblick auf das Zusammenwirken von TLR-2 und -6 in der PG-Erkennung sowie der möglichen Kooperation von TLR-2 mit TLR-1 bzw. -6 *in vitro* (Ozinsky *et al.*, 2000) wäre im besonderen die Rolle von TLR-1 und -6 in den hier beschriebenen System zu verifizieren.

Des weiteren könnten genauere chemische Charakterisierungen der beiden Glykolipide sowie Experimente mit weiteren Liganden dazu beitragen, die strukturellen Voraussetzungen der unterschiedlichen TLR-Benutzung zu ergründen.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der intrazellulären Signalkaskaden der durch die mikrobielle Moleküle stimulierten Zellen. Der Einfluß des Adapterproteins MyD88 und der Proteinkinase NIK in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch die *Treponema*-Glykolipide und LTAs sowie die Bedeutung der MAP-Kinasen p42/44 und p38 in der TNF- α -Induktion konnten aufgezeigt werden. Unter der Annahme der differentiellen Signalweiterleitung durch verschiedene TLRs erscheint eine weitere Aufklärung der durch TB und TM initiierten intrazellulären Kaskaden interessant. Weiterhin wären die genaueren Zusammenhänge zwischen den TLRs und den MAPK-Kaskaden zu untersuchen.

Die Aufklärung der molekularen Mechanismen des Immunsystems bei der Erkennung und Bekämpfung von Pathogenen könnte dazu beitragen, neue Behandlungsmöglichkeiten gegen schwerwiegende Infektionen und Sepsis zu erhalten. Die Mortalität der Sepsis und des septischen Schocks ist mit 30-50 % fast unverändert sehr hoch (Freeman and Natanson, 2000). Verschiedene Therapieansätze der letzten Jahre zielten auf eine Regulierung des Entzündungsgeschehens durch Beeinflussungen der LPS- und der Zytokin-Effekte sowie mit Hilfe von Glukokortikoiden. Bisher blieben diese Versuche nahezu erfolglos (Freeman and Natanson, 2000). Eine medikamentöse Blockierung der TLRs oder wichtiger Signaling-Moleküle zur Vermeidung überschießender Entzündungsantworten erscheint, insbesondere wegen ihrer höheren Selektivität, möglicherweise erfolgversprechender.

Des weiteren ist aufgrund der Verbindungen zwischen angeborener und erworbener Immunantwort ein Zusammenhang zwischen Fehlregulationen der angeborenen Immunantwort und dem Auftreten von Autoimmunkrankheiten sowie Allergien vorstell-

bar (Medzhitov and Janeway, 2000). Auch im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung dieser Krankheiten erscheint eine weitere Erforschung des Immunsystems notwendig.

5 Literaturverzeichnis

- Aderem, A. und Ulevitch, R. J. (2000): Toll-like receptors in the induction of the innate immune response, *Nature* (406), 782-7.
- Aderem, A. und Underhill, D. M. (1999): Mechanisms of phagocytosis in macrophages, *Annu Rev Immunol* (17), 593-623.
- Akashi, S.; Shimazu, R.; Ogata, H.; Nagai, Y.; Takeda, K.; Kimoto, M. und Miyake, K. (2000): Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages, *J Immunol* (164), 3471-5.
- Alessi, D. R.; Cuenda, A.; Cohen, P.; Dudley, D. T. und Saltiel, A. R. (1995): PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo, *J Biol Chem* (270), 27489-94.
- Aliprantis, A. O.; Yang, R. B.; Mark, M. R.; Suggett, S.; Devaux, B.; Radolf, J. D.; Klimpel, G. R.; Godowski, P. und Zychlinsky, A. (1999): Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2, *Science* (285), 736-9.
- Anderson, K. V. (2000): Toll signaling pathways in the innate immune response, *Curr Opin Immunol* (12), 13-9.
- Anderson, K. V.; Bokla, L. und Nüsslein-Volhard, C. (1985a): Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product, *Cell* (42), 791-8.
- Anderson, K. V.; Jurgens, G. und Nüsslein-Volhard, C. (1985b): Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product, *Cell* (42), 779-89.
- Arbibe, L.; Mira, J. P.; Teusch, N.; Kline, L.; Guha, M.; Mackman, N.; Godowski, P. J.; Ulevitch, R. J. und Knaus, U. G. (2000): Toll-like receptor 2-mediated NF-kappaB activation requires a Rac1-dependent pathway, *Nature Immunology* (1), 533-540.
- Arbour, N. C.; Lorenz, E.; Schutte, B. C.; Zabner, J.; Kline, J. N.; Jones, M.; Frees, K.; Watt, J. L. und Schwartz, D. A. (2000): TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans, *Nat Genet* (25), 187-91.
- Archibald, A. R. und Baddiley, J. (1966): The teichoic acids, *Adv Carbohydr Chem Biochem* (21), 323-75.

- Baeuerle, P. A. und Baltimore, D. (1988a): Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor, *Cell* (53), 211-7.
- Baeuerle, P. A. und Baltimore, D. (1988b): I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor, *Science* (242), 540-6.
- Belich, M. P.; Salmeron, A.; Johnston, L. H. und Ley, S. C. (1999): TPL-2 kinase regulates the proteolysis of the NF-kappaB-inhibitory protein NF-kappaB1 p105, *Nature* (397), 363-8.
- Belvin, M. P. und Anderson, K. V. (1996): A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway, *Annu Rev Cell Dev Biol* (12), 393-416.
- Brade, L.; Brade, H. und Fischer, W. (1990): A 28 kDa protein of normal mouse serum binds lipopolysaccharides of gram-negative and lipoteichoic acids of gram-positive bacteria, *Microb Pathog* (9), 355-62.
- 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. und Modlin, R. L. (1999): Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors, *Science* (285), 732-6.
- Burns, K.; Clatworthy, J.; Martin, L.; Martinon, F.; Plumpton, C.; Maschera, B.; Lewis, A.; Ray, K.; Tschopp, J. und Volpe, F. (2000): Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor, *Nature Cell Biology* (2), 346-351.
- Canagarajah, B. J.; Khokhlatchev, A.; Cobb, M. H. und Goldsmith, E. J. (1997): Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation, *Cell* (90), 859-69.
- Cao, Z.; Henzel, W. J. und Gao, X. (1996a): IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor, *Science* (271), 1128-31.
- Cao, Z.; Xiong, J.; Takeuchi, M.; Kurama, T. und Goeddel, D. V. (1996b): TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1, *Nature* (383), 443-6.
- Chaudhary, P. M.; Ferguson, C.; Nguyen, V.; Nguyen, O.; Massa, H. F.; Eby, M.; Jasmin, A.; Trask, B. J.; Hood, L. und Nelson, P. S. (1998): Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans, *Blood* (91), 4020-7.
- Choi, B. K.; Nattermann, H.; Grund, S.; Haider, W. und Göbel, U. B. (1997): Spirochetes from digital dermatitis lesions in cattle are closely related to treponemes associated with human periodontitis, *Int J Syst Bacteriol* (47), 175-81.

- Choi, B. K.; Paster, B. J.; Dewhirst, F. E. und Göbel, U. B. (1994): Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis, *Infect Immun* (62), 1889-95.
- Chow, J. C.; Young, D. W.; Golenbock, D. T.; Christ, W. J. und Gusovsky, F. (1999): Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction, *J Biol Chem* (274), 10689-92.
- Cleveland, R. F.; Holtje, J. V.; Wicken, A. J.; Tomasz, A.; Daneo-Moore, L. und Shockman, G. D. (1975): Inhibition of bacterial wall lysins by lipoteichoic acids and related compounds, *Biochem Biophys Res Commun* (67), 1128-35.
- Cuenda, A.; Rouse, J.; Doza, Y. N.; Meier, R.; Cohen, P.; Gallagher, T. F.; Young, P. R. und Lee, J. C. (1995): SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1, *FEBS Lett* (364), 229-33.
- De Kimpe, S. J.; Kengatharan, M.; Thiemermann, C. und Vane, J. R. (1995): The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure, *Proc Natl Acad Sci U S A* (92), 10359-63.
- Defosse, D. L. und Johnson, R. C. (1992): In vitro and in vivo induction of tumor necrosis factor alpha by *Borrelia burgdorferi*, *Infect Immun* (60), 1109-13.
- Delhase, M.; Hayakawa, M.; Chen, Y. und Karin, M. (1999): Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation, *Science* (284), 309-13.
- DiDonato, J. A.; Hayakawa, M.; Rothwarf, D. M.; Zandi, E. und Karin, M. (1997): A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B, *Nature* (388), 548-54.
- Ding, A.; Hwang, S.; Lander, H. M. und Xie, Q. W. (1995): Macrophages derived from C3H/HeJ (Lpsd) mice respond to bacterial lipopolysaccharide by activating NF- κ B, *J Leukoc Biol* (57), 174-9.
- Dziarski, R.; Wang, Q.; Miyake, K.; Kirschning, C. J. und Gupta, D. (2001): MD-2 Enables Toll-Like Receptor 2 (TLR2)-Mediated Responses to Lipopolysaccharide and Enhances TLR2-Mediated Responses to Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria and Their Cell Wall Components, *J Immunol* (166), 1938-1944.
- Epstein, J.; Eichbaum, Q.; Sheriff, S. und Ezekowitz, R. A. (1996): The collectins in innate immunity, *Curr Opin Immunol* (8), 29-35.

- Fan, X.; Stelter, F.; Menzel, R.; Jack, R.; Spreitzer, I.; Hartung, T. und Schutt, C. (1999): Structures in *Bacillus subtilis* are recognized by CD14 in a lipopolysaccharide binding protein-dependent reaction, *Infect Immun* (67), 2964-8.
- Fischer, W. (1994): Lipoteichoic acid and lipids in the membrane of *Staphylococcus aureus*, *Med Microbiol Immunol* (183), 61-76.
- Fischer, W.; Mannsfeld, T. und Hagen, G. (1990): On the basic structure of poly(glycerophosphate) lipoteichoic acids, *Biochem Cell Biol* (68), 33-43.
- Fischer, W.; Rosel, P. und Koch, H. U. (1981): Effect of alanine ester substitution and other structural features of lipoteichoic acids on their inhibitory activity against autolysins of *Staphylococcus aureus*, *J Bacteriol* (146), 467-75.
- Flo, T. H.; Halaas, O.; Lien, E.; Ryan, L.; Teti, G.; Golenbock, D. T.; Sundan, A. und Espevik, T. (2000): Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide, *J Immunol* (164), 2064-9.
- Fraser, I. P.; Koziel, H. und Ezekowitz, R. A. (1998): The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity, *Semin Immunol* (10), 363-72.
- Freeman, B. D. und Natanson, C. (2000): Anti-inflammatory therapies in sepsis and septic shock, *Expert Opin Investig Drugs* (9), 1651-63.
- Gay, N. J. und Keith, F. J. (1991): *Drosophila* Toll and IL-1 receptor, *Nature* (351), 355-6.
- Ghosh, S.; May, M. J. und Kopp, E. B. (1998): NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses, *Annu Rev Immunol* (16), 225-60.
- Gopalbhai, K. und Meloche, S. (1998): Repression of mitogen-activated protein kinases ERK1/ERK2 activity by a protein tyrosine phosphatase in rat fibroblasts transformed by upstream oncoproteins, *J Cell Physiol* (174), 35-47.
- Greenfeder, S. A.; Nunes, P.; Kwee, L.; Labow, M.; Chizzonite, R. A. und Ju, G. (1995): Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex, *J Biol Chem* (270), 13757-65.
- Gupta, D.; Kirkland, T. N.; Viriyakosol, S. und Dziarski, R. (1996): CD14 is a cell-activating receptor for bacterial peptidoglycan, *J Biol Chem* (271), 23310-6.
- Hambleton, J.; McMahon, M. und DeFranco, A. L. (1995): Activation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinase in murine macrophages partially mimics lipopolysaccharide-induced signaling events, *J Exp Med* (182), 147-54.

- Hambleton, J.; Weinstein, S. L.; Lem, L. und DeFranco, A. L. (1996): Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages, *Proc Natl Acad Sci U S A* (93), 2774-8.
- Han, J.; Lee, J. D.; Bibbs, L. und Ulevitch, R. J. (1994): A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells, *Science* (265), 808-11.
- Hashimoto, C.; Hudson, K. L. und Anderson, K. V. (1988): The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein, *Cell* (52), 269-79.
- Hashimoto, M.; Imamura, Y.; Morichika, T.; Arimoto, K.; Takeuchi, O.; Takeda, K.; Akira, S.; Aoyama, K.; Tamura, T.; Kotani, S.; Suda, Y. und Kusumoto, S. (2000): Cytokine-inducing macromolecular glycolipids from *Enterococcus hirae*: improved method for separation and analysis of its effects on cellular activation, *Biochem Biophys Res Commun* (273), 164-9.
- Heine, H.; Kirschning, C. J.; Lien, E.; Monks, B. G.; Rothe, M. und Golenbock, D. T. (1999): Cutting edge: cells that carry a null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin, *J Immunol* (162), 6971-5.
- Hemmi, H.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Kaisho, T.; Sato, S.; Sanjo, H.; Matsumoto, M.; Hoshino, K.; Wagner, H.; Takeda, K. und Akira, S. (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA., *Nature* (408), 740-5.
- Heptinstall, S.; Archibald, A. R. und Baddiley, J. (1970): Teichoic acids and membrane function in bacteria, *Nature* (225), 519-21.
- Hirschfeld, M.; Kirschning, C. J.; Schwandner, R.; Wesche, H.; Weis, J. H.; Wooten, R. M. und Weis, J. J. (1999): Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2, *J Immunol* (163), 2382-6.
- Hirschfeld, M.; Ma, Y.; Weis, J. H.; Vogel, S. N. und Weis, J. J. (2000): Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2, *J Immunol* (165), 618-22.
- Hirschfeld, M.; Weis, J. J.; Toshchakov, V.; Salkowski, C. A.; Cody, M. J.; Ward, D. C.; Qureshi, N.; Michalek, S. M. und Vogel, S. N. (2001): Signaling by Toll-Like Receptor 2 and 4 Agonists Results in Differential Gene Expression in Murine Macrophages, *Infect Immun* (69), 1477-1482.
- Hoffmann, J. A.; Kafatos, F. C.; Janeway, C. A. und Ezekowitz, R. A. (1999): Phylogenetic perspectives in innate immunity, *Science* (284), 1313-8.

- Hu, Y.; Baud, V.; Delhase, M.; Zhang, P.; Deerinck, T.; Ellisman, M.; Johnson, R. und Karin, M. (1999): Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of I κ B kinase, *Science* (284), 316-20.
- Hummell, D. S. und Winkelstein, J. A. (1986): Bacterial lipoteichoic acid sensitizes host cells for destruction by autologous complement, *J Clin Invest* (77), 1533-8.
- Ip, Y. T. und Davis, R. J. (1998): Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development, *Curr Opin Cell Biol* (10), 205-19.
- Irie, T.; Muta, T. und Takeshige, K. (2000): TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages, *FEBS Lett* (467), 160-4.
- Ishihara, K. und Okuda, K. (1999): Molecular pathogenesis of the cell surface proteins and lipids from *Treponema denticola*, *FEMS Microbiol Lett* (181), 199-204.
- Iwasaki, H.; Shimada, A.; Yokoyama, K. und Ito, E. (1989): Structure and glycosylation of lipoteichoic acids in *Bacillus* strains, *J Bacteriol* (171), 424-9.
- Janeway, C. A., Jr. (1989): Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (54), 1-13.
- Janeway, C. A., Jr. (1999): The role of self-recognition in receptor repertoire development. Members of the Janeway Laboratory, *Immunol Res* (19), 107-18.
- Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M. und Copra, J. D. (1999): *Immunobiology. The Immune System in Health and Disease*, 4. Auflage, Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc., London
- Kanakaraj, P.; Schafer, P. H.; Cavender, D. E.; Wu, Y.; Ngo, K.; Grealish, P. F.; Wadsworth, S. A.; Peterson, P. A.; Siekierka, J. J.; Harris, C. A. und Fung-Leung, W. P. (1998): Interleukin (IL)-1 receptor-associated kinase (IRAK) requirement for optimal induction of multiple IL-1 signaling pathways and IL-6 production, *J Exp Med* (187), 2073-9.
- Karin, M. und Ben-Neriah, Y. (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity, *Annu Rev Immunol* (18), 621-63.
- Kawai, T.; Adachi, O.; Ogawa, T.; Takeda, K. und Akira, S. (1999): Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin, *Immunity* (11), 115-22.
- Keller, R.; Fischer, W.; Keist, R. und Bassetti, S. (1992): Macrophage response to bacteria: induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids, *Infect Immun* (60), 3664-72.

- Kengatharan, K. M.; De Kimpe, S.; Robson, C.; Foster, S. J. und Thiernemann, C. (1998): Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure, *J Exp Med* (188), 305-15.
- Khokhlatchev, A. V.; Canagarajah, B.; Wilsbacher, J.; Robinson, M.; Atkinson, M.; Goldsmith, E. und Cobb, M. H. (1998): Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation, *Cell* (93), 605-15.
- Kirschning, C. J.; Wesche, H.; Merrill Ayres, T. und Rothe, M. (1998): Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide, *J Exp Med* (188), 2091-7.
- Kobayashi, Y.; Miyaji, C.; Watanabe, H.; Umezu, H.; Hasegawa, G.; Abo, T.; Arakawa, M.; Kamata, N.; Suzuki, H.; Kodama, T. und Naito, M. (2000): Role of macrophage scavenger receptor in endotoxin shock, *J Pathol* (192), 263-72.
- Kolch, W. (2000): Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions, *Biochem J* (351), 289-305.
- Kopp, E.; Medzhitov, R.; Carothers, J.; Xiao, C.; Douglas, I.; Janeway, C. A. und Ghosh, S. (1999): ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway, *Genes Dev* (13), 2059-71.
- Kurt-Jones, E. A.; Popova, L.; Kwinn, L.; Haynes, L. M.; Jones, L. P.; Tripp, R. A.; Walsh, E. E.; Freeman, M. W.; Golenbock, D. T.; Anderson, L. J. und Finberg, R. W. (2000): Pattern recognition receptors TLR-4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus, *Nature Immunology* (1), 398-401.
- Lambert, P. A.; Hancock, I. C. und Baddiley, J. (1977): Occurrence and function of membrane teichoic acids, *Biochim Biophys Acta* (472), 1-12.
- Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B. *et al.* (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* (409), 860-921.
- Lee, J. C.; Laydon, J. T.; McDonnell, P. C.; Gallagher, T. F.; Kumar, S.; Green, D.; McNulty, D.; Blumenthal, M. J.; Heys, J. R.; Landvatter, S. W. und *et al.* (1994): A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis, *Nature* (372), 739-46.
- Lemaitre, B.; Nicolas, E.; Michaut, L.; Reichhart, J. M. und Hoffmann, J. A. (1996): The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults, *Cell* (86), 973-83.
- Lemaitre, B.; Reichhart, J. M. und Hoffmann, J. A. (1997): *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms, *Proc Natl Acad Sci U S A* (94), 14614-9.

- Levashina, E. A.; Langley, E.; Green, C.; Gubb, D.; Ashburner, M.; Hoffmann, J. A. und Reichhart, J. M. (1999): Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*, *Science* (285), 1917-9.
- Lewis, T. S.; Shapiro, P. S. und Ahn, N. G. (1998): Signal transduction through MAP kinase cascades, *Adv Cancer Res* (74), 49-139.
- Lien, E.; Means, T. K.; Heine, H.; Yoshimura, A.; Kusumoto, S.; Fukase, K.; Fenton, M. J.; Oikawa, M.; Qureshi, N.; Monks, B.; Finberg, R. W.; Ingalls, R. R. und Golenbock, D. T. (2000): Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide, *J Clin Invest* (105), 497-504.
- Lien, E.; Sellati, T. J.; Yoshimura, A.; Flo, T. H.; Rawadi, G.; Finberg, R. W.; Carroll, J. D.; Espevik, T.; Ingalls, R. R.; Radolf, J. D. und Golenbock, D. T. (1999): Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products, *J Biol Chem* (274), 33419-25.
- Lin, X.; Cunningham, E. T., Jr.; Mu, Y.; Geleziunas, R. und Greene, W. C. (1999): The proto-oncogene Cot kinase participates in CD3/CD28 induction of NF-kappaB acting through the NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinases, *Immunity* (10), 271-80.
- Lin, X.; Mu, Y.; Cunningham, E. T., Jr.; Marcu, K. B.; Geleziunas, R. und Greene, W. C. (1998): Molecular determinants of NF-kappaB-inducing kinase action, *Mol Cell Biol* (18), 5899-907.
- Lorenz, E.; Mira, J. P.; Cornish, K. L.; Arbour, N. C. und Schwartz, D. A. (2000): A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection, *Infect Immun* (68), 6398-401.
- Malinin, N. L.; Boldin, M. P.; Kovalenko, A. V. und Wallach, D. (1997): MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1, *Nature* (385), 540-4.
- Means, T. K.; Wang, S.; Lien, E.; Yoshimura, A.; Golenbock, D. T. und Fenton, M. J. (1999): Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*, *J Immunol* (163), 3920-7.
- Medzhitov, R. und Janeway, C. A., Jr. (1997a): Innate immunity: impact on the adaptive immune response, *Curr Opin Immunol* (9), 4-9.
- Medzhitov, R. und Janeway, C. A., Jr. (1997b): Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition, *Cell* (91), 295-8.
- Medzhitov, R. und Janeway, C., Jr. (2000): Innate immunity, *N Engl J Med* (343), 338-44.

- Medzhitov, R.; Preston-Hurlburt, P. und Janeway, C. A., Jr. (1997): A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity, *Nature* (388), 394-7.
- Medzhitov, R.; Preston-Hurlburt, P.; Kopp, E.; Stadlen, A.; Chen, C.; Ghosh, S. und Janeway, C. A., Jr. (1998): MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways, *Mol Cell* (2), 253-8.
- Mercurio, F.; Zhu, H.; Murray, B. W.; Shevchenko, A.; Bennett, B. L.; Li, J.; Young, D. B.; Barbosa, M.; Mann, M.; Manning, A. und Rao, A. (1997): IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation, *Science* (278), 860-6.
- Middelveld, R. J. und Alving, K. (2000): Synergistic septicemic action of the gram-positive bacterial cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid in the pig in vivo, *Shock* (13), 297-306.
- Morath, S.; Geyer, A. und Hartung, T. (2001): Structure-Function Relationship of Cytokine Induction by Lipoteichoic Acid from *Staphylococcus aureus*, *J Exp Med* (193), 393-398.
- Muller, J. M.; Ziegler-Heitbrock, H. W. und Baeuerle, P. A. (1993): Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects, *Immunobiology* (187), 233-56.
- Muzio, M.; Bosisio, D.; Polentarutti, N.; D'Amico, G.; Stoppacciaro, A.; Mancinelli, R.; van't Veer, C.; Penton-Rol, G.; Ruco, L. P.; Allavena, P. und Mantovani, A. (2000): Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells, *J Immunol* (164), 5998-6004.
- Muzio, M.; Natoli, G.; Saccani, S.; Levrero, M. und Mantovani, A. (1998): The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6), *J Exp Med* (187), 2097-101.
- Muzio, M.; Ni, J.; Feng, P. und Dixit, V. M. (1997): IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling, *Science* (278), 1612-5.
- Nick, J. A.; Avdi, N. J.; Gerwins, P.; Johnson, G. L. und Worthen, G. S. (1996): Activation of a p38 mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide, *J Immunol* (156), 4867-75.
- Ninomiya-Tsuji, J.; Kishimoto, K.; Hiyama, A.; Inoue, J.; Cao, Z. und Matsumoto, K. (1999): The kinase TAK1 can activate the NIK-I κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway, *Nature* (398), 252-6.

- Norgard, M. V.; Arndt, L. L.; Akins, D. R.; Curetty, L. L.; Harrich, D. A. und Radolf, J. D. (1996): Activation of human monocytic cells by *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides proceeds via a pathway distinct from that of lipopolysaccharide but involves the transcriptional activator NF-kappa B, *Infect Immun* (64), 3845-52.
- Opitz, B.; Schröder, N. W.; Spreitzer, I.; Michelsen, K. S.; Kirschning, C. J.; Hallatschek, W.; Zähringer, U.; Hartung, T.; Göbel, U. B. und Schumann, R. R. (2001): Toll-like receptor-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation, *J Biol Chem* (276), 22041-7.
- Ozinsky, A.; Underhill, D. M.; Fontenot, J. D.; Hajjar, A. M.; Smith, K. D.; Wilson, C. B.; Schroeder, L. und Aderem, A. (2000): The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A* (97), 13766-71.
- Payne, D. M.; Rossomando, A. J.; Martino, P.; Erickson, A. K.; Her, J. H.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; Weber, M. J. und Sturgill, T. W. (1991): Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase), *Embo J* (10), 885-92.
- Polotsky, V. Y.; Fischer, W.; Ezekowitz, R. A. und Joiner, K. A. (1996): Interactions of human mannose-binding protein with lipoteichoic acids, *Infect Immun* (64), 380-3.
- Poltorak, A.; He, X.; Smirnova, I.; Liu, M. Y.; Huffel, C. V.; Du, X.; Birdwell, D.; Alejos, E.; Silva, M.; Galanos, C.; Freudenberg, M.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Layton, B. und Beutler, B. (1998): Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene, *Science* (282), 2085-8.
- Poltorak, A.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Citterio, S. und Beutler, B. (2000): Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (97), 2163-7.
- Regnier, C. H.; Song, H. Y.; Gao, X.; Goeddel, D. V.; Cao, Z. und Rothe, M. (1997): Identification and characterization of an IkappaB kinase, *Cell* (90), 373-83.
- Reszka, A. A.; Seger, R.; Diltz, C. D.; Krebs, E. G. und Fischer, E. H. (1995): Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton, *Proc Natl Acad Sci U S A* (92), 8881-5.
- Riley, B. S.; Oppenheimer-Marks, N.; Hansen, E. J.; Radolf, J. D. und Norgard, M. V. (1992): Virulent *Treponema pallidum* activates human vascular endothelial cells, *J Infect Dis* (165), 484-93.

- Rock, F. L.; Hardiman, G.; Timans, J. C.; Kastelein, R. A. und Bazan, J. F. (1998): A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll, *Proc Natl Acad Sci U S A* (95), 588-93.
- Roitt, I.; Brostoff, J. und Male, D. (1998): *Immunology*, 5. Auflage, Mosby Int. Ltd., London
- Rosen, G.; Sela, M. N.; Naor, R.; Halabi, A.; Barak, V. und Shapira, L. (1999): Activation of murine macrophages by lipoprotein and lipooligosaccharide of *Treponema denticola*, *Infect Immun* (67), 1180-6.
- Rothwarf, D. M.; Zandi, E.; Natoli, G. und Karin, M. (1998): IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I-kappaB kinase complex, *Nature* (395), 297-300.
- Rutault, K.; Hazzalin, C. A. und Mahadevan, L. C. (2001): Combinations of ERK and p38 MAPK inhibitors ablate tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) mRNA induction. Evidence for selective destabilization of TNF-alpha transcripts, *J Biol Chem* (276), 6666-74.
- Rutschmann, S.; Jung, A. C.; Zhou, R.; Silverman, N.; Hoffmann, J. A. und Ferrandon, D. (2000): Role of *Drosophila* IKK-gamma in a Toll-independent antibacterial immune response, *Nature Immunology* (1), 342-347.
- Salmeron, A.; Ahmad, T. B.; Carlile, G. W.; Pappin, D.; Narsimhan, R. P. und Ley, S. C. (1996): Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase, *Embo J* (15), 817-26.
- Schaeffer, H. J. und Weber, M. J. (1999): Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers, *Mol Cell Biol* (19), 2435-44.
- Schindler, U. und Baichwal, V. R. (1994): Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression, *Mol Cell Biol* (14), 5820-31.
- Schrank, K.; Choi, B. K.; Grund, S.; Moter, A.; Heuner, K.; Nattermann, H. und Göbel, U. B. (1999): *Treponema brennaborensis* sp. nov., a novel spirochaete isolated from a dairy cow suffering from digital dermatitis, *Int J Syst Bacteriol* (49), 43-50.
- Schröder, N. W. J.; Opitz, B.; Lamping, N.; Michelsen, K. S.; Zähringer, U.; Göbel, U. B. und Schumann, R. R. (2000): Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *treponema* glycolipids, *J Immunol* (165), 2683-93.

- Schröder, N. W.; Pfeil, D.; Opitz, B.; Michelsen, K. S.; Amberger, J.; Zähringer, U.; Göbel, U. B. und Schumann, R. R. (2001): Activation of mitogen-activated protein kinases p42/44, p38, and stress-activated protein kinases in myelo-monocytic cells by *Treponema lipoteichoic acid*, *J Biol Chem* (276), 9713-9.
- Schultz, C. P.; Wolf, V.; Lange, R.; Mertens, E.; Wecke, J.; Naumann, D. und Zähringer, U. (1998): Evidence for a new type of outer membrane lipid in oral spirochete *Treponema denticola*. Functioning permeation barrier without lipopolysaccharides, *J Biol Chem* (273), 15661-6.
- Schumann, R. R.; Leong, S. R.; Flagg, G. W.; Gray, P. W.; Wright, S. D.; Mathison, J. C.; Tobias, P. S. und Ulevitch, R. J. (1990): Structure and function of lipopolysaccharide binding protein, *Science* (249), 1429-31.
- Schwandner, R.; Dziarski, R.; Wesche, H.; Rothe, M. und Kirschning, C. J. (1999): Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2, *J Biol Chem* (274), 17406-9.
- Sellati, T. J.; Bouis, D. A.; Caimano, M. J.; Feulner, J. A.; Ayers, C.; Lien, E. und Radolf, J. D. (1999): Activation of human monocytic cells by *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum* is facilitated by CD14 and correlates with surface exposure of spirochetal lipoproteins, *J Immunol* (163), 2049-56.
- Sen, R. und Baltimore, D. (1986): Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences, *Cell* (46), 705-16.
- Shimazu, R.; Akashi, S.; Ogata, H.; Nagai, Y.; Fukudome, K.; Miyake, K. und Kimoto, M. (1999): MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4, *J Exp Med* (189), 1777-82.
- Song, H. Y.; Regnier, C. H.; Kirschning, C. J.; Goeddel, D. V. und Rothe, M. (1997): Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2, *Proc Natl Acad Sci U S A* (94), 9792-6.
- Takeuchi, O.; Hoshino, K. und Akira, S. (2000a): Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to staphylococcus aureus infection, *J Immunol* (165), 5392-6.
- Takeuchi, O.; Hoshino, K.; Kawai, T.; Sanjo, H.; Takada, H.; Ogawa, T.; Takeda, K. und Akira, S. (1999): Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components, *Immunity* (11), 443-51.

- Takeuchi, O.; Kaufmann, A.; Grote, K.; Kawai, T.; Hoshino, K.; Morr, M.; Muhlradt, P. F. und Akira, S. (2000b): Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway, *J Immunol* (164), 554-7.
- Tapping, R. I.; Akashi, S.; Miyake, K.; Godowski, P. J. und Tobias, P. S. (2000): Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for escherichia and salmonella lipopolysaccharides, *J Immunol* (165), 5780-7.
- Tsai, E. Y.; Falvo, J. V.; Tsytsykova, A. V.; Barczak, A. K.; Reimold, A. M.; Glimcher, L. H.; Fenton, M. J.; Gordon, D. C.; Dunn, I. F. und Goldfeld, A. E. (2000): A lipopolysaccharide-specific enhancer complex involving Ets, Elk-1, Sp1, and CREB binding protein and p300 is recruited to the tumor necrosis factor alpha promoter in vivo, *Mol Cell Biol* (20), 6084-94.
- Tuyt, L. M.; Dokter, W. H.; Birkenkamp, K.; Koopmans, S. B.; Lummen, C.; Kruijer, W. und Vellenga, E. (1999): Extracellular-regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase, and c-Jun are involved in NF-kappa B-dependent IL-6 expression in human monocytes, *J Immunol* (162), 4893-902.
- Ulevitch, R. J. und Tobias, P. S. (1999): Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system, *Curr Opin Immunol* (11), 19-22.
- Underhill, D. M.; Ozinsky, A.; Hajjar, A. M.; Stevens, A.; Wilson, C. B.; Bassetti, M. und Aderem, A. (1999a): The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens, *Nature* (401), 811-5.
- Underhill, D. M.; Ozinsky, A.; Smith, K. D. und Aderem, A. (1999b): Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages, *Proc Natl Acad Sci U S A* (96), 14459-63.
- Vanden Berghe, W.; Plaisance, S.; Boone, E.; De Bosscher, K.; Schmitz, M. L.; Fiers, W. und Haegeman, G. (1998): p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor, *J Biol Chem* (273), 3285-90.
- Venter, J. C.; Adams, M. D.; Myers, E. W. *et al.* (2001): The sequence of the human genome, *Science* (291), 1304-51.
- Wesche, H.; Gao, X.; Li, X.; Kirschning, C. J.; Stark, G. R. und Cao, Z. (1999): IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family, *J Biol Chem* (274), 19403-10.

- Wesche, H.; Henzel, W. J.; Shillinglaw, W.; Li, S. und Cao, Z. (1997): MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex, *Immunity* (7), 837-47.
- Wicken, A. J.; Evans, J. D. und Knox, K. W. (1986): Critical micelle concentrations of lipoteichoic acids, *J Bacteriol* (166), 72-7.
- Wicken, A. J. und Knox, K. W. (1975): Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigen, *Science* (187), 1161-7.
- Widmann, C.; Gibson, S.; Jarpe, M. B. und Johnson, G. L. (1999): Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human, *Physiol Rev* (79), 143-80.
- Williams, M. J.; Rodriguez, A.; Kimbrell, D. A. und Eldon, E. D. (1997): The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense, *Embo J* (16), 6120-30.
- Woronicz, J. D.; Gao, X.; Cao, Z.; Rothe, M. und Goeddel, D. V. (1997): IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK, *Science* (278), 866-9.
- Wright, S. D.; Ramos, R. A.; Tobias, P. S.; Ulevitch, R. J. und Mathison, J. C. (1990): CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein, *Science* (249), 1431-3.
- Xu, Y; Tao, X; Shen, B; Horng, T; Medzhitov, R; Manley, J.L. und Tong, L. (2000): Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains, *Nature* (408), 111-5.
- Yamaoka, S.; Courtois, G.; Bessia, C.; Whiteside, S. T.; Weil, R.; Agou, F.; Kirk, H. E.; Kay, R. J. und Israel, A. (1998): Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation, *Cell* (93), 1231-40.
- Yang, H.; Young, D. W.; Gusovsky, F. und Chow, J. C. (2000): Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1, *J Biol Chem* (275), 20861-6.
- Yang, R. B.; Mark, M. R.; Gray, A.; Huang, A.; Xie, M. H.; Zhang, M.; Goddard, A.; Wood, W. I.; Gurney, A. L. und Godowski, P. J. (1998): Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling, *Nature* (395), 284-8.
- Yaron, A.; Hatzubai, A.; Davis, M.; Lavon, I.; Amit, S.; Manning, A. M.; Andersen, J. S.; Mann, M.; Mercurio, F. und Ben-Neriah, Y. (1998): Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase, *Nature* (396), 590-4.

Yoshimura, A.; Lien, E.; Ingalls, R. R.; Tuomanen, E.; Dziarski, R. und Golenbock, D. (1999): Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2, *J Immunol* (163), 1-5.

You, M.; Flick, L. M.; Yu, D. und Feng, G. S. (2001): Modulation of the Nuclear Factor kappaB Pathway by Shp-2 Tyrosine Phosphatase in Mediating the Induction of Interleukin (IL)-6 by IL-1 or Tumor Necrosis Factor, *J Exp Med* (193), 101-110.

Zandi, E.; Rothwarf, D. M.; Delhase, M.; Hayakawa, M. und Karin, M. (1997): The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation, *Cell* (91), 243-52.

Zhang, F. X.; Kirschning, C. J.; Mancinelli, R.; Xu, X. P.; Jin, Y.; Faure, E.; Mantovani, A.; Rothe, M.; Muzio, M. und Arditi, M. (1999): Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes, *J Biol Chem* (274), 7611-4.

Zhang, G. und Ghosh, S. (2001): Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity, *J Clin Invest* (107), 13-19.

6 Anhang

6.1 Danksagung

Für die Auswahl des sehr interessanten Themas, für die fachliche Beratung und für die Bereitstellung der für die Laborarbeit benötigten Mittel möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Ralf R. Schumann bedanken. Ihm und vielen Mitarbeitern seines Labors ist das in mir erweckte Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten zu verdanken. Des Weiteren bin ich Herrn Prof. Dr. Ralf R. Schumann für die Möglichkeiten, meine Ergebnisse auf Fachkongressen zu präsentieren, sehr dankbar.

Herrn Dr. Carsten J. Kirschning von der TU-München danke ich für vielerlei technischen Rat, die Überlassung von Plasmiden und für die Möglichkeit, in seinem Labor neue Techniken zu erlernen. Für die bereitgestellten LTAs bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. T. Hartung und Ingo Spreitzer von der Universität-Konstanz.

Nicolas W. J. Schröder, aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf R. Schumann, gebührt mein Dank für die von ihm präparierten *Treponema*-Glykolipide und für die kompetente fachliche Beratung. Dr. Dagmar Pfeil, Werner Hallatschek, Kathrin Michelsen, Fränzi Creutzburg, Oliver Singer, Eicke Latz, Nicole Siegemund, Michaela Müller, Johannes Amberger, Marcel Berger und Anja Martini, aus der AG Schumann, bin ich für die fachlichen und technischen Hilfestellungen sehr dankbar. Mein besonderer Dank gilt hierbei Fränzi Creutzburg und Werner Hallatschek für ihre selbstlose und hilfsbereite Art und für die mit ihnen und anderen Laborkollegen erlebten schönen Labortage und Abende. Ganz besonders herzlich möchte ich mich zudem bei Michaela Müller bedanken.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken, die es mir durch ihre ideelle und materielle Unterstützung ermöglichten, mich in der vergangenen Zeit auf diese Arbeit zu konzentrieren.

6.2 Veröffentlichungen

6.2.1 Originalarbeiten

Opitz B., Schröder N. W. J., Spreitzer I., Michelsen K. S., Kirschning C. J., Hallatschek W., Zähringer U., Hartung T., Göbel U. B., Schumann R. R. (2001): *Toll-like* receptor (TLR)-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid (LTA)-induced NF- κ B translocation, *J Biol Chem* (276), 22041-7.

Schröder N. W. J., Opitz B., Lamping N., Michelsen K. S., Zähringer U., Göbel U. B., Schumann R. R. (2000): Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and *Toll-like* receptors in the initiation of innate immunity response by *Treponema* glycolipids, *J Immunol* (165), 2683-93.

Schröder N. W. J., Pfeil D., Opitz B., Michelsen K. S., Amberger J., Zähringer U., Göbel U. B., Schumann R. R. (2000): Activation of mitogen-activated protein kinases p42/44, p38, and stress-activated protein kinases in myelo-monocytic cells by *Treponema* lipoteichoic acid, *J Biol Chem* (276), 9713-9.

6.2.2 Kongreßbeiträge

Opitz B., Schröder N. W. J., Hallatschek W., Pfeil D., Michelsen K. S., Göbel U. B., Schumann R. R. (2000): Distinct utilization of *Toll-like* receptor (TLR)-2 and -4 for NF- κ B induction by glycolipids from two closely related *Treponema* species, *Biospectrum* 2000, 15.K.2.05, 117 (Abstract).

Opitz B., Schröder N. W. J., Hallatschek W., Michelsen K. S., Pfeil D., Zähringer U., Göbel U. B., Schumann R. R. (2000): Two novel glycolipids of closely related *Treponema* species differentially utilize *Toll-like* receptors (TLRs) for induction of NF- κ B, *J Endotoxin Res* (6), 2, 181 (Abstract).

Opitz B., Schröder N. W. J., Spreitzer I., Michelsen K. S., Kirschning C. J., Hallatschek W., Zähringer U., Hartung T., Göbel U. B., Schumann R. R. (2001): *Toll-like* receptor (TLR)-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid (LTA)-induced NF- κ B translocation, *101th General Meeting American Society for Microbiology* (Abstract).

6.3 Lebenslauf

Bastian Opitz
Pappelallee 36
10437 Berlin

Geburtsdatum: 13. Februar 1976

Geburtsort: Berlin

Eltern Prof. Dr. Charlotte Opitz, Dr. Hermann Wagner

1982-1990	Besuch der Polytechnischen Oberschule „10. OS“, Berlin
1990-1995	Besuch des Gymnasiums „John Lennon“, Berlin
Juni 1995	Abitur
WS1995/96	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin
September 1997	Ärztliche Vorprüfung
September 1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
WS 1998/99	Forschungssemester, Beginn der Anfertigung des experimentellen Teils der Dissertationsarbeit in der AG Prof. Dr. R. R. Schumann Institut für Mikrobiologie und Hygiene Universitätsklinikum Charité, Berlin
2.3.-31.3.1998	1. Famulatur: Innere Medizin, Caritas-Kliniken Pankow
16.8.-15.9.1999	2. Famulatur: Innere Medizin, Royal United Hospital, Bath, GB
21.2.-22.3.2000	3. Famulatur: Kinderheilkunde, Praxis Dr. S. Brandstätter
8.9.-7.10.2000	4. Famulatur: Orthopädie, Park-Klinik Weißensee
Aug./Sept. 2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
29.10.01-15.2.02	1. PJ-Tertial: Neurologie, Jüdisches KH Berlin
18.2.-7.6.2002	2. PJ-Tert.: Chirurgie, Mayo General Hospital Castlebar, Irland
10.6.-27.9.2002	3. PJ-Tertial: Innere Medizin, KH im Friedrichshain Berlin

6.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Bastian Opitz, an Eides Statt, daß die vorliegende Dissertationsarbeit von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die verwendete Literatur sind vollständig angegeben.