Untersuchungen zur pharmakologischen Beeinflussung der Toll-like Rezeptoren in der Sepsis

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der naturwissenschaftlichen
Fakultät IV-Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katharina Brandl
aus Regensburg
2005

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Franz, Institut für Pharmazeutische Biologie

Prof. Dr. rer. nat. Werner Falk, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender	: Prof. Dr. rer. nat. A. Göpferich
1. Gutachter (1. Prüfer)	: Prof. Dr. rer. nat. G. Franz
2. Gutachter (2. Prüfer)	: Prof. Dr. rer. nat. W. Falk
3. Prüfer	: Prof. Dr. rer. nat. J. Heilmann

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Oktober 2005

Dissertation

durchgeführt von Oktober 2002 bis Juni 2005
am Institut für Innere Medizin I der Universität Regensburg
unter Anleitung von

Prof. Dr. rer. nat. G. Franz

Institut für Pharmazeutische Biologie

und

Prof. Dr. rer. nat. W. Falk

Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I

Für meinen Bruder Johannes

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis 5
2 Einleitung 10
2.1 Bedeutung und Pathophysiologie der Sepsis 10
2.2 Das Immunsystem- ein Überblick 12
2.3 Klassische *pathogen recognition receptors* (PRRs) 13
2.4 Drosophila Toll 15
2.5 Toll Proteine der Wirbeltiere 17
2.6 TLR Signaltransduktion 18
2.6.1 MyD88-abhängige Signaltransduktion 18
2.6.2 MyD88-unabhängige Signaltransduktion 19
2.7 Bedeutung der TLRs in der Sepsis 21
2.8 TLR4/MD-2 22
2.9 TLR2 23
2.10 Lösliche Rezeptoren 24
2.11 Ziele 26
3 Material und Methoden 28
3.1 Materialien und Geräte 28
3.1.1 Geräte 28
3.1.2 Verbrauchsmaterial und Plastikartikel 28
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien 29
3.1.4 Puffer und Lösungen 30
3.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze, Antibiotika 33
3.1.6 Antikörper und Kopplungsreagenzien 33
3.1.7 Enzyme, Inhibitoren und Kits 33
3.1.8 Molekulargewichtsstandards 34
3.1.9 Vektoren und Plasmide 35
3.1.10 Primersequenzen 35
3.1.11 Bakterien und Zelllinien 36
3.2 Molekularbiologische Methoden 37
3.2.1 Kultivierung von Bakterien 37
3.2.2 Plasmidvektoren 38
3.2.2.1 Mini-/ Maxi-Präparation 38
3.2.2.2 Transformation von E.coli 38

3.2.3 Präparation, PCR, enzymatische Manipulation, Analyse und Sequenzierung von DNA 39
3.2.3.1 Gelelektrophorese 39
3.2.3.2 Polymerase Ketten Reaktion (PCR) 39
3.2.3.3 Restriktionsverdau 40
3.2.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten durch Gelextraktion 40
3.2.3.5 Klonierung von DNA-Fragmenten 41
3.2.3.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA 41
3.3 Zellbiologische Methoden 41
3.3.1 Kulturbedingungen 41
3.3.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung 41
3.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen 42
3.3.4 Stimulationsexperimente mit TLR Liganden in RAW 264.7 42
3.3.4.1 Transwellassay 42
3.3.5 Transfektionen 43
3.3.5.1 Calciumphosphattransfektion 43
3.3.5.2 Transfektionen mit kationischen Liposomen 43
3.3.5.2.1 Stabile Transfektion in S2 Zellen 44
3.4 Immunologische Methoden 44
3.4.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 44
3.4.2 Durchflusszytometrie 45
3.4.3 Herstellen monoklonaler Antikörper 47
3.4.3.1 Immunisieren einer Maus 47
3.4.3.2 Fusion 48
3.4.4 Herstellung polyklonaler Antikörper 49
3.5 Proteinchemische Methoden 49
3.5.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE 49
3.5.2 Western Blotting 49
3.5.2.1 Semi-dry-Technik 49
3.5.2.2 Tank-Blot Technik 50
3.5.3 Nachweis von Proteinen 50
3.5.3.1 Färbung von Proteinen in Gelen 50
3.5.3.2 Immunofärbung von Proteinblots 51
3.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration 51
3.5.5 Immunpräzipitation 51
3.5.6 LPS-Bindungsassay 52
3.5.7 Affinitätschromatographie 52

3.5.7.1 Protein A Affinitätchromatographie 52
3.5.7.2 Affinitätschromatographie über Metallchelatbindende Säulen 52
3.5.8 Größenausschlusschromatographie 53
3.5.9 Chemische oder enzymatische Veränderung an Proteinen oder Naturstoffen 53
3.5.9.1 Biotinylierung von LPS 53
3.5.9.2 Protease Xa Verdau 54
3.6 *In vivo* Experimente mit NMRI Mäusen 54
3.6.1 Gewinnung von Serum aus Vollblut 54
3.7 Statistik 54
4 Ergebnisse 56
4.1 Pharmakologische Beeinflussung der Signaltransduktion über Toll-like Rezeptor (TLR)2 und TLR4 56
4.1.1 Untersuchung der Effekte von löslichem TLR2 und löslichem TLR4 auf die Signaltransduktion über TLR 56
4.1.1.1 Klonierung von T2Fc und T4Fc 56
4.1.1.2 Expression von T2Fc und T4Fc 57
4.1.1.3 Biochemische Charakterisierung von T2Fc und T4Fc 58
4.1.1.4 Reinigung von T2Fc und T4Fc 59
4.1.1.5 Untersuchung des Einflusses von T2Fc und T4Fc auf die proinflammatorische Reaktion von RAW 264.7 nach Stimulierung durch mikrobielle Antigene in vitro 60
4.1.1.5.1 Synergistischer Effekt von T2Fc auf die mit Pam3Cys bzw. LTA induzierte IL-6 Sekretion 60
4.1.1.5.2 Kein Einfluss von T4Fc auf die LPS induzierte IL-6 Sekretion 62
4.1.1.5.3 Expression von T4Fc in HEK 293 Zellen und Testung seiner biologischen Aktivität 63
4.1.2 Der Komplex aus T4Fc und MD-2 hemmt LPS Aktivität *in vitro* 64
4.1.2.1 Rolle von MD-2 65
4.1.2.1.1 Expression von MD-2 65
4.1.2.1.2 Nachweis des T4Fc/MD-2 Komplexes 65
4.1.2.2 Der Komplex aus T4Fc und MD-2 bindet LPS 67
4.1.2.2.1 Herstellung von biotinyliertem LPS 67
4.1.2.2.2 „LPS Pull-down assay“ 68
4.1.2.3 Der Komplex aus T4Fc/MD-2 hemmt die LPS induzierte IL-6 Sekretion in RAW 264.7 *in vitro* 69
4.1.2.4 Generierung des T4Fc/MD-2 Komplexes *in vitro* 70
4.1.2.4.1 Klonierung und Expression von MD-2 in S2 Zellen 70
4.1.2.4.2 Reinigung von Flag-MD-2-His 71

4.1.2.4.3 Biologische Aktivität von Flag-MD-2-His 72
4.1.3 Das Designermolekül LPS-Trap neutralisiert LPS Aktivität *in vitro* 74
4.1.3.1 Generierung der LPS-Trap 74
4.1.3.1.1 Klonierung der LPS-Trap und LPS-Trap-Fc für die Expression in S2 Zellen 74
4.1.3.1.2 Klonierung der LPS-Trap und LPS-Trap-Fc für die Expression in eukaryotischen Zellen 75
4.1.3.1.3 Expression der LPS-Trap und LPS-Trap-Fc in S2 Zellen 75
4.1.3.1.4 Expression der LPS-Trap und LPS-Trap-Fc in HEK 293 Zellen 76
4.1.3.1.5 Reinigung der LPS-Trap und LPS-Trap-Fc 77
4.1.3.2 Biologische Aktivität der LPS-Trap 78
4.1.3.2.1 Immunpräzipitation mit MTS 510 78
4.1.3.2.2 Die LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc bindet LPS 78
4.1.3.2.3 Nur monomere LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc bindet LPS 79
4.1.3.3 Herstellung einer mutierten LPS-Trap 81
4.1.3.3.1 Klonierung der mutierten LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc 82
4.1.3.3.2 Expression der mutierten LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc 82
4.1.3.3.3 Biologische Aktivität der mutierten LPS-Trap 83
4.1.3.3.4 Mutierte LPS-Trap bindet kein LPS 85
4.1.3.3.5 Generierung monomerer LPS-Trap 86
4.1.3.4 Inhibitorische Aktivität der LPS-Trap 87
4.1.3.5 Produktion der LPS-Trap in verschiedenen Expressionssystemen 88
4.1.3.5.1 Expression in Säugerzellen 88
4.1.3.5.2 Expression im Baculovirus-System 89
4.1.3.5.3 Expression in S2 Zellen 91
4.1.3.6 Test der LPS-Trap *in vivo* 91
4.2 Herstellung von Antikörpern gegen den extrazellulären Teil von TLR2 bzw. TLR4 92
4.2.1 Polyklonale Antikörper gegen den extrazellulären Teil von TLR2 bzw. TLR4 93
4.2.2 Monoklonale Antikörper gegen den extrazellulären Teil von TLR4 95
4.3 Untersuchung der Dichte von TLR2 und TLR4 auf Monozyten und Granulozyten im peripheren Blut bei Patienten mit Sepsis und gesunden Kontrollen 96
4.3.1 Etablierung eine Protokolls für die Durchflusszytometrie 96
4.3.2 Patientenkollektiv 97
4.3.3 Untersuchungen der Dichte von TLR2 auf Monozyten und Granulozyten 97
4.3.4 Untersuchungen der Dichte von TLR4 auf Monozyten und Granulozyten 98
5 Diskussion 100
5.1 TLRs und ihre Rolle in der Pathophysiologie von Infektionskrankheiten 100

5.2 Beeinflussung der Signaltransduktion über TLRs 101
5.2.1 Neutralisierung von LPS 101
5.2.1.1 Anti-Endotoxin-Antikörper 101
5.2.1.2 Modulation der LPS-Signaltransduktion auf der Ebene von CD14 102
5.2.1.4 Weitere Strategien der Anti-LPS-Behandlung 103
5.2.1.5 Limitationen von Anti-LPS-Strategien 103
5.2.2 Beeinflussung der Signaltransduktion über TLR direkt auf der Rezeptor-Ebene 103
5.2.2.1 Beeinflussung der Signaltransduktion über TLR2 mit löslichem TLR2 104
5.2.2.2 Beeinflussung der Signaltransduktion über TLR4 mit löslichem TLR4 105
5.2.2.3 Beeinflussung der Signaltransduktion über TLR4 mit dem Komplex T4Fc/MD-2... 106
5.3 Polyklonale und monoklonale Antikörper gegen lösliches TLR2 bzw. TLR4 110
5.4 Untersuchungen zur Dichte von TLR2 und TLR4 auf Zellen des peripheren Blutes 111
6 Zusammenfassung 113
7 Abkürzungen 115
8 Literaturverzeichnis 119
9 Anhang 132
9.1 Danksagungen 132
9.2 Publikationen 134
9.3 Lebenslauf 136
9.4 Eidesstattliche Erklärung 138

2 Einleitung

2.1 Bedeutung und Pathophysiologie der Sepsis

Sepsis bezeichnet den Zustand einer schweren, systemischen Entzündungsreaktion des Organismus bei der Auseinandersetzung mit einer (meist bakteriellen) Infektion.

In den USA ist Sepsis eine der häufigsten Todesursachen auf nichtkardiologischen Intensivstationen mit ungefähr 450 000 Sepsis-Fällen pro Jahr (Angus *et al*, 2001). Die Hälfte dieser Patienten entwickelt eine schwere Sepsis oder einen septischen Schock. Die Letalität hierbei mit begleitendem Multiorganversagen (MOF) beträgt trotz großer Fortschritte in der supportiven Therapie der intensivmedizinischen Versorgung immer noch 50 – 70 % (Opal & Cross, 1999).

Ausgangspunkt einer Sepsis ist in den meisten Fällen eine lokal begrenzte Infektion. Gerät dieser Prozess außer Kontrolle und lassen sich die Erreger systemisch nachweisen, so ist nach dem Katalog der Konsensus-Konferenz des *American College of Chest Physicians* und der *Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SSCM) das wichtigste Kriterium für die Sepsis erfüllt (Bone *et al*, 1992). Außerdem müssen zudem noch mindestens zwei der folgenden Reaktionen auftreten, um vom Vollbild einer Sepsis zu sprechen: Hypo- oder Hyperthermie, Tachykardie, Tachypnoe, Leukozytose oder Leukopenie. Eine schwere Sepsis liegt vor, wenn es zusätzlich zu einer infektionsbezogenen Organdysfunktion kommt. Auch der septische Schock wird klar definiert. Die Kriterien sind identisch mit der schweren Sepsis; anstatt der infektionsbezogenen Organdysfunktion wird jedoch der Nachweis einer arteriellen Hypotonie trotz adäquater Volumentherapie verlangt.

Ein wesentliches Charakteristikum der Pathophysiologie von Sepsis und septischem Schock ist die systemische Entzündung als Reaktion auf zirkulierende mikrobielle Antigene (Hotchkiss & Karl, 2003). Nach Kontakt mit Bestandteilen der bakteriellen Zellwand – Lipopolysaccharid (LPS) bei Gram-negativen sowie Peptidoglykane und Lipoteichonsäure (LTA) bei Gram-positiven Keimen – wird die angeborene Immunität aktiviert, und es werden in der frühen Phase der Infektion Zytokine von verschiedenen Immunzellen sezerniert. Obwohl diese Zytokine eine wichtige Rolle in der Abwehrreaktion spielen, so werden beispielsweise aktivierte Neutrophile zum Entzündungsort gelockt, führt das Eintreten dieser Zytokine und bakterieller Substanzen in den Blutkreislauf zu einer Kette von pathophysiologischen Ereignissen, die in ihrer Komplexität vereinfacht in Abb. 2.1 dargestellt werden (Cohen, 2002).

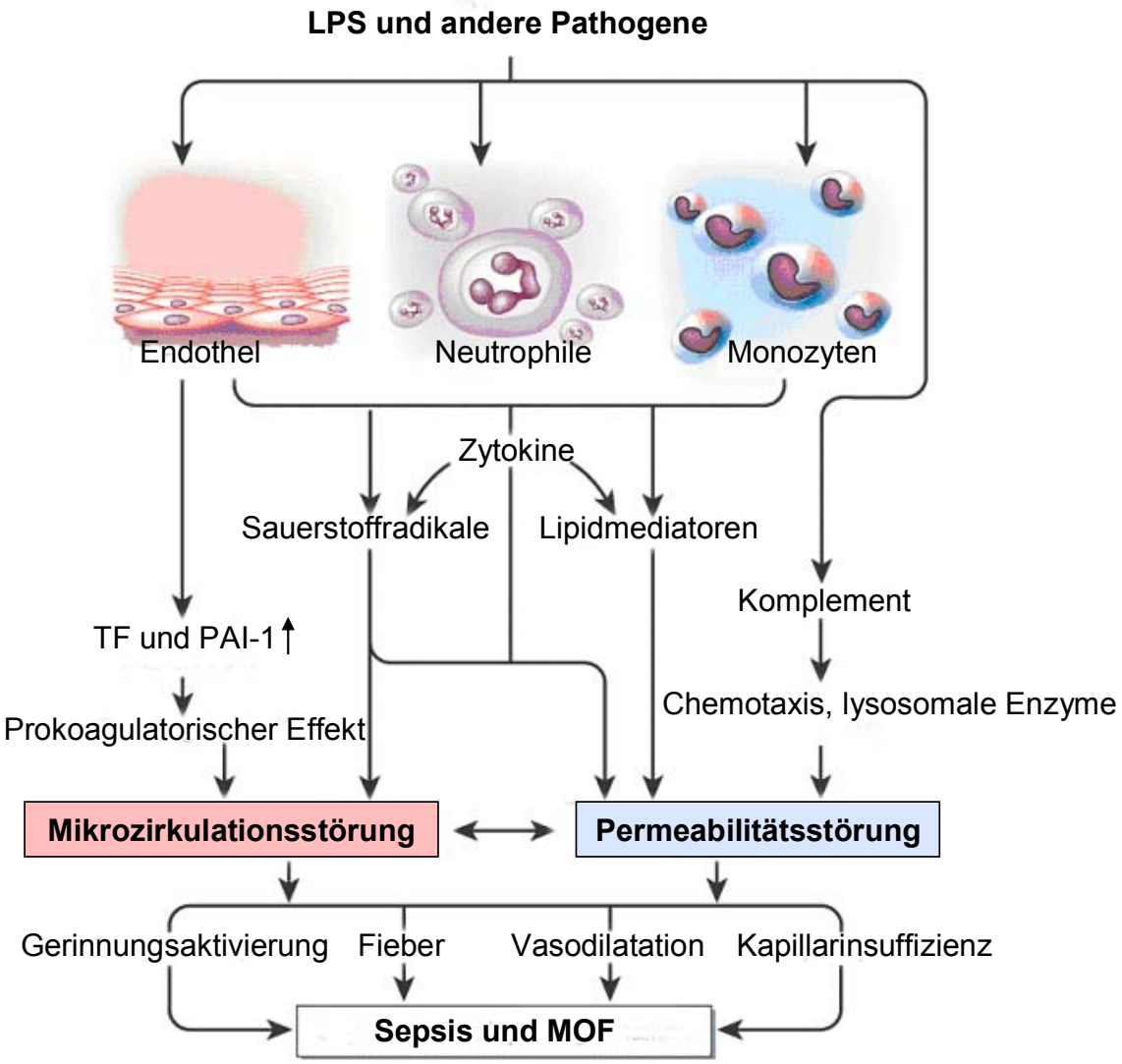


Abb. 2.1: Pathomechanismen der Sepsis. LPS und andere mikrobielle Pathogene aktivieren parallel mehrere Kaskaden, die zur Gerinnungsaktivierung, Permeabilitätsstörung und Mikrozirkulationsstörung, schließlich zur Gewebshypoxie und so zum Organversagen führen. Die Folge davon sind Sepsis, Schock und MOF.
Modifiziert nach (Cohen, 2002).

Bei der Entzündungsreaktion auf Kontakt mit mikrobiellen Strukturen steht das angeborene Immunsystem mit anderen Systemen in direktem Kontakt. So ist die akute Entzündung z.B. von einer Aktivierung des Gerinnungssystems begleitet (Marshall, 2001; Opal & Cross, 1999). Proinflammatorische Zytokine, die auf die Endothelzelle einwirken, führen zur Freisetzung von *tissue factor* (TF) und zu erhöhten *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) Spiegeln und stimulieren somit prokoagulatorische Kaskaden. Diesen stehen physiologische antikoagulatorische und fibrinolytische Mechanismen entgegen, welche unter den Bedingungen der Sepsis nicht selten erschöpft sind. Bereits in frühen Stadien der Sepsis finden sich verminderte Konzentrationen physiologischer Antikoagulantien wie *Antithrombin III*, *Protein C/Protein S-System* und *tissue factor pathway inhibitor*. Bei einer Störung des

Gleichgewichtes zwischen Gerinnung und Fibrinolyse durch die systemische Anreicherung von Prothrombinaktivatoren und den Verbrauch von fibrinolytischen Faktoren kommt es zu einer systemischen Gerinnungsneigung, die als disseminierte intravasale Gerinnung bezeichnet wird. Blutgerinnsel können Kapillargebiete lebenswichtiger Organe verstopfen und führen zu Mikrozirkulationsstörungen. Durch den fortlaufenden Verbrauch an Fibrinogen und Thrombozyten kommt es nachfolgend zu einer erhöhten Blutungsneigung (Levi *et al*, 1999). Zudem ist die Initialphase der Entzündungsreaktion durch eine Aktivierung des Komplementsystems gekennzeichnet (Galley & Webster, 1996). Die aktiven Komponenten C3a, C4a und C5a können beispielsweise Neutrophile und Makrophagen zur Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen anregen. Komplementfaktoren induzieren zudem eine Vasodilatation, erhöhen die Kapillarpermeabilität mit hämodynamischen Veränderungen und fördern die Aggregation von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten (Schlag & Redl, 1996).

Somit führt die systemische Entzündungsreaktion über Vasodilatation, vermehrte Kapillarpermeabilität und disseminierte Gerinnungsaktivierung zu lokaler Hypoperfusion, Hypotonie und Organversagen bzw. MOF, was letztlich die Haupttodesursache der Sepsis ist (Cohen, 2002).

2.2 Das Immunsystem- ein Überblick

Normalerweise verteidigt das Immunsystem höhere Vertebraten vor pathogenen Mikroorganismen. Nur in bestimmten Fällen, beispielsweise bei der überschießenden Reaktion der angeborenen Immunität in der Sepsis, kann es dem Organismus Schaden zufügen. Das Immunsystem, ein hochdifferenzierter und anpassungsfähiger Abwehrapparat, setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Mit Hilfe dieser beiden Komponenten kann das Immunsystem Pathogene als Reize erfassen, auf diese mit einer spezifischen Antwort reagieren und das Ereignis in Erinnerung behalten. Das angeborene Immunsystem dient der ersten Abwehr und wird z.B. durch Neutrophile, Makrophagen und Dendritische Zellen vermittelt. Es beruht auf keimbahnkodierten Rezeptoren, die häufig vorkommende Merkmale von Pathogenen erkennen, sog. Molekülerkennungsrezeptoren. Weitere Charakteristika der angeborenen Immunität sind schnelle Effektor-Mechanismen wie Phagozytose, Aktivierung von proteolytischen Kaskaden und Synthese von potenten antimikrobiellen Peptiden (Medzhitov & Janeway, Jr., 2000). Diese Mechanismen sind zwar von entscheidender Bedeutung und verhindern fast immer die Entstehung eines Infektionsherdes, werden jedoch manchmal von pathogenen Mikroorganismen überwunden. Reicht dieses System zur Verteidigung nicht aus, durchbricht also ein infektiöser Organismus diese ersten Abwehrlinien, löst er eine adaptive

Immunantwort aus. Diese wird von dem angeborenen Immunsystem kontrolliert und koordiniert (Medzhitov & Janeway, Jr., 1997).

Das adaptive Immunsystem wird als das „spezifische Immunsystem“ bezeichnet, seine Zellen als T- und B-Lymphozyten. Charakteristisch für dieses System ist eine gezielte Beseitigung von Pathogenen durch antigenspezifische Effektorzellen. Durch somatische Rekombination wird eine fast unlimitierte Zahl von Immunrezeptoren erhalten. Außerdem bilden sich im Rahmen einer adaptiven Immunantwort Gedächtniszellen, die eine erneute Infektion mit dem Mikroorganismus verhindern können. Mit diesen Mechanismen kann das adaptive Immunsystem effizient gegen Pathogene vorgehen, die durch die angeborene Immunität nicht eliminiert werden konnten. In der ersten Phase einer Infektion agiert ausschließlich die angeborene Immunität, erst nach 3-4 Tagen koordinieren beide Systeme, das angeborene als auch das erworbene Immunsystem, die Entzündungsreaktion. Die wesentlichen Unterschiede zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst (Janeway, Jr. & Medzhitov, 2002b).

Eigenschaften	**Angeborenes Immunsystem**	**Adaptives Immunsystem**
Spezifität	nur für bestimmte Molekülmuster die in verschiedenen Pathogengruppen vorkommen	für Antigene von Pathogenen und andere nichtmikrobielle Antigene
Mannigfaltigkeit	limitiert	sehr groß
Gedächtnis	nein	ja
Erkennung von „eigen“	ja	ja, allerdings Fehler möglich
Komponenten		
Physikal. u. chem. Barrieren	Haut, Epithelien, antimikrobielle Agenzien	Lymphozyten in Epithelzell-schicht, sezernierte Antikörper auf Epitheloberfläche
Plasmaproteine	Komplememt	Antikörper
Zellen	Phagozyten (Makrophagen, Neutrophile), Dendritische Zellen	Lymphozyten

Tab. 2.1: Vergleich der Eigenschaften und Komponenten des angeborenen und des adaptiven Immunsystems.

2.3 Klassische *pathogen recognition receptors* (PRRs)

Die angeborene Immunität beruht auf keimbahnkodierten Rezeptoren, die bestimmte Strukturmerkmale von Pathogenen erkennen. Diese molekularen Strukturen sind in der Regel für das Überleben der Pathogene essentiell, so dass sie sehr konserviert und konstitutiv vorkommen. Die Molekülerkennungsrezeptoren werden unter dem Begriff *pathogen recognition receptors* (PRRs) zusammengefasst (Medzhitov & Janeway, Jr., 1997)

und können funktionell in drei Klassen unterteilt werden: Sezernierte, endozytierende und signaltransferierende (Janeway, Jr. & Medzhitov, 2002a). Die sezernierten PRRs wirken als Opsonine. Sie binden an mikrobielle Zellwände und markieren sie zur weiteren Erkennung durch das Komplementsystem und durch Phagozyten. Ein Opsonin ist z.B. das Mannanbindende Lektin, welches an mannosehaltige Kohlenhydrate an der Oberfläche von Bakterien und Viren bindet und den Mannan-Bindungs-Lektin-Weg der Komplementaktivierung initiiert (Fraser *et al*, 1998). Ein weiteres Opsonin ist C3b, ein wichtiges Effektormolekül des Komplementsystems, welches außerdem essentiell für die Bildung des membranangreifenden Komplexes ist (Ehlers, 2000). Der membranangreifende Komplex erzeugt in der Zellmembran bestimmter Bakterien Poren, die für bestimmte Krankheitserreger tödlich sein können.

Die zweite Gruppe von PRRs, die endozytierenden PRRs, kommen auf der Oberfläche von Phagozyten vor. Nach der Erkennung bestimmter mikrobieller Moleküle erfolgt die Aufnahme und Zerstörung der Pathogene in Lysosomen. Pathogeneigene Proteine werden dann prozessiert und auf MHC-Molekülen der Makrophagenoberfläche präsentiert. Gleichzeitig kommt es zur Freisetzung verschiedener Effektoren und Zytokine (Medzhitov & Janeway, Jr., 2000). Der Mannose-Rezeptor auf Makrophagen, ein Mitglied der C-Typ Lektin Familie, interagiert spezifisch, auch ohne vorherige Opsonierung, mit mannosereichen Kohlenhydraten auf Bakterien, wodurch es zur Phagozytose des Pathogens durch den Makrophagen kommt (Aderem & Underhill, 1999; Fraser *et al*, 1998). Dectin-1, ein weiteres Mitglied der C-Typ Lektin Familie, wirkt nicht nur als endozytierender Rezeptor, sondern ist auch ein Korezeptor eines anderen PRRs, dem Toll-like Rezeptor (TLR)2 (siehe 2.9) (Brown *et al*, 2003). Scavenger Rezeptoren (z.B. CD36 und CD91) sind weitere Rezeptoren dieser Gruppe, die ein ungewöhnlich breites Spektrum an anionischen Polymeren und auch acetylierte *low-density* Lipoproteine mit geringer Dichte erkennen und phagozytieren (Febbraio *et al*, 2001; Herz & Strickland, 2001). Hoebe *et al.* identifizierten CD36 kürzlich als weiteren Korezeptor für TLR2, essentiell für die Signaltransduktion von diacylierten Lipopeptiden und LTA (Hoebe *et al*, 2005). Die letzte Gruppe der PRRs ist durch die Fähigkeit gekennzeichnet, die Information der Pathogenerkennung mit Hilfe von Signaltransduktionskaskaden in die Zelle weiterzuleiten und daraufhin die Expression verschiedener Gene der Immunantwort zu induzieren. Neben den TLRs (siehe 2.4/2.5), spielt die Familie der *nucleotidebinding-oligomerization-domain* (NOD)s eine zunehmend wichtige Rolle in der angeborenen Immunität.

Diese relativ neue Gruppe von PRRs erkennen Pathogene intrazellulär. NODs, auch als *caspase-activating and recruitment domain* (CARD)s bezeichnet, bestehen aus drei Komponenten. Zusätzlich zur zentralen NOD Domäne besitzen sie C-terminal Leucin-reiche Regionen (*leucine rich repeats,* LRR) und eine (bzw. zwei für NOD2) N-terminale CARD

Domäne(n) (Athman & Philpott, 2004). Die Erkennung der Pathogene erfolgt durch die LRR. NOD1 und NOD2 erkennen verschiedene Peptidoglykanstrukturen. Die minimale Peptidoglykanstruktur zur Aktivierung von NOD1 ist ein D-Glu-*meso*-diamino-Pimelinsäure Dipeptid (meist aus Gram-negativen Bakterien). NOD2 hingegen ist ein Sensor für Muramyldipeptid, welches sowohl in Peptidoglykanen von Gram-negativen als auch von Gram-positiven Bakterien vorkommt (Athman & Philpott, 2004; Inohara *et al*, 2004). Nach Aktivierung kommt es zur Interaktion der CARD-Domänen von NOD1 bzw. NOD2 mit der CARD-Domäne von *receptor interacting protein 2* (Rip2) und letztendlich zur Induktion von Transkriptionsfaktoren wie Adapterprotein-1 (AP-1), ELK-1 und *nuclear factor κB* (NF-κB) (Inohara *et al*, 2004), welche die Expression verschiedener Gene der Immunantwort induzieren.

2.4 Drosophila Toll

Die bekannteste Gruppe von PRRs, welche die angeborene Immunität mit Hilfe von Signaltransduktionskaskaden aktiviert, ist die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs). Das Toll-Protein wurde ursprünglich 1984 von der Biochemikerin Christiane Nüsslein-Volhard in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert (Anderson & Nüsslein-Volhard, 1984). Es spielt dort sowohl eine Rolle in der dorsoventralen Entwicklung des Embryos als auch, wesentlich später entdeckt, in der Immunantwort auf Gram-positive Bakterien und Pilze. Das Protein Toll ist ein Typ I Transmembran Rezeptor. Während der extrazelluläre Teil aus LRR besteht, enthält der intrazelluläre Teil eine dem Interleukin (IL)-1 Rezeptor homologe Domäne, die so genannte Toll/IL-1 Rezeptor (TIR)- Domäne (Gay & Keith, 1991). Wird Toll über seine Liganden, wie z.B. durch Proteasen gespaltenes *Spätzle,* aktiviert, kommt es zur Rekrutierung der Adaptorproteine *Tube, Pelle* und *Cactus* und letztendlich zur Stimulierung des NF-κB ähnlichen Transkriptionsfaktors *Dorsal*. Dies führt zur Induktion antimikrobieller Proteine wie Drosomycin, Diptericin und Defensin (Abb. 2.2) (Rutschmann et al, 2002).

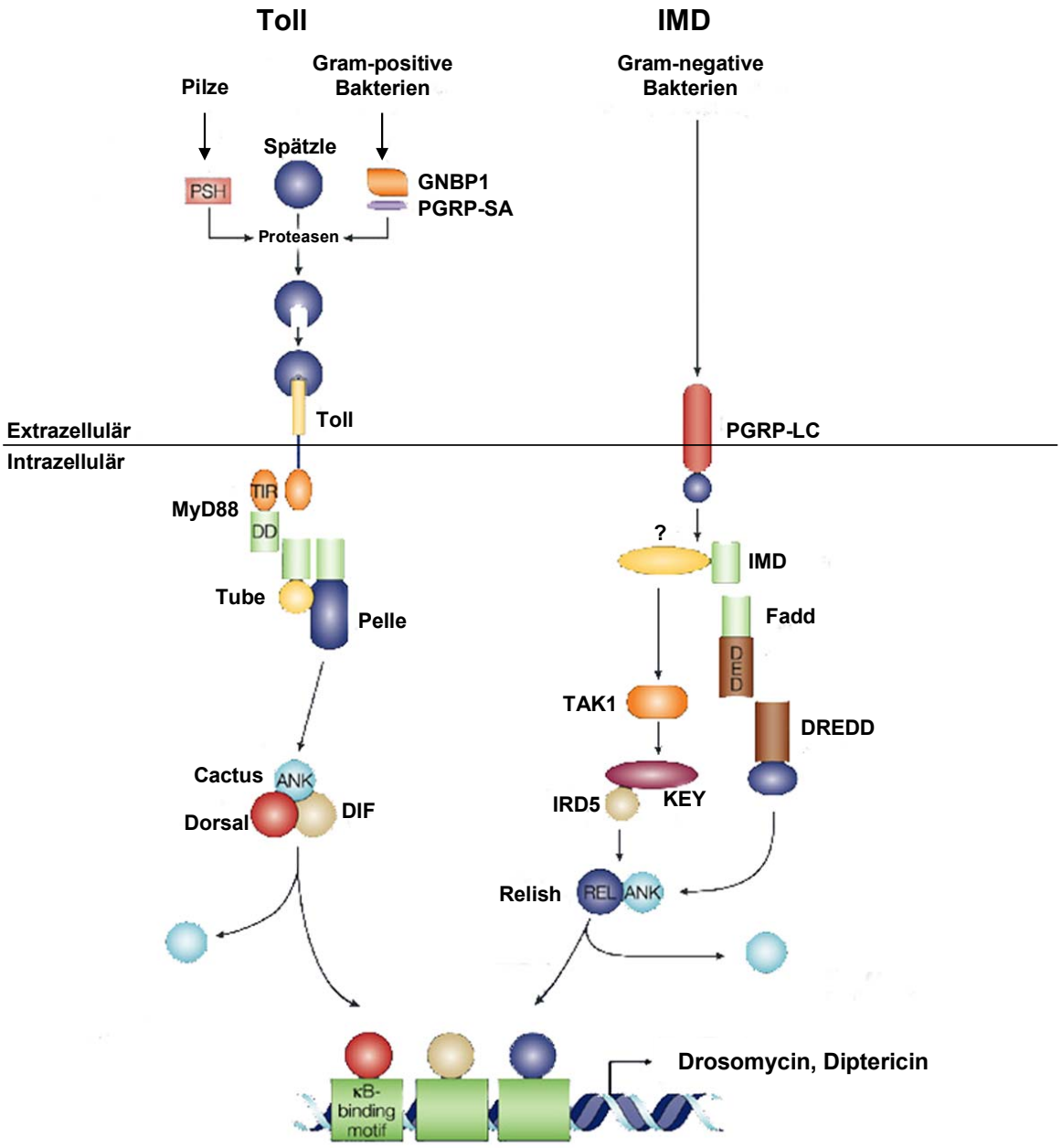


Abb. 2.2: Signalkaskaden über das Toll- und das *immune deficiency* (IMD)-Gen. Die Produktion antibakterieller Peptide (z.B. Drosomycin und Diptericidin) wird von 2 Signalkaskaden reguliert, über Toll bzw. über IMD vermittelt. Pathogen bindende Moleküle wie *Gram-negative bacteria binding protein 1* (GNBP1) und *peptidoglycan-recognition protein* (PGRP)-SA, aktivieren proteolytische Kaskaden, wodurch es zur Spaltung des Proteins *Spätzle* kommt. Gespaltenes *Spätzle* aktiviert Toll und die Adaptoren MyD88 und *Tube* werden rekrutiert. Dem folgt die Stimulierung und Aktivierung der Kinase *Pelle*. *Cactus* wird daraufhin phosphoryliert und degradiert, und es kommt zur Translokation des Transkriptionsfaktors *Dorsal related immunity factor* (DIF).
Die Signalkaskade über IMD wird wahrscheinlich durch eine Interaktion zwischen PGRP-LC und Peptidoglykanen von Gram-negativen Bakterien ausgelöst. Nach der Aktivierung von PGRP-LC wird das Adaptormolekül IMD rekrutiert. IMD bindet *FAS-associated death domain* (Fadd), welches mit der Caspase *Death-related ced-3/Nedd2-like protein* (DREDD) interagiert. DREDD assoziiert mit *Relish*, nachdem dieses von dem *Drosophila inhibitor of NFκB (IκB)-kinase* (IKK) Komplex phosphoryliert wurde. Der IKK Komplex besteht aus *immune response deficient 5* (IRD5) und Kenny (KEY) und wird selbst von *Transforming-growth-factor-β-kinase 1* (TAK1) IMD-abhängig aktiviert. Caspase DREDD schneidet *Relish*, die *Rel* Domäne wandert in den Nukleus und reguliert dort die Transkription der Gene für die Immunabwehr.
Modifiziert nach (Lemaitre, 2004)

Der Toll Rezeptor in *Drosophila* wird im Unterschied zu den TLRs im humanen System (siehe 2.5) nicht direkt von Pathogenen stimuliert, sondern über proteolytische Kaskaden gespaltene Proteine (wie z.B. durch gespaltenes *Spätzle*) induziert. Diese proteolytischen Kaskaden werden von Bestandteilen Gram-positiver Bakterien und Pilze ausgelöst bzw. aktiviert. Das Immunsystem von *Drosophila* ist ebenso in der Lage, zwischen verschiedenen Pathogenen zu unterscheiden. Demnach existieren in der Fruchtfliege auch PRRs. Während die Signalkaskade über den Toll Rezeptor vor allem von Gram-positiven Bakterien und von Pilzen ausgelöst wird, aktivieren Gram-negative Bakterien hauptsächlich die Kaskade über das Produkt des *immune deficiency* (IMD)-Gens (Abb. 2.2).

2.5 Toll Proteine der Wirbeltiere

Zwölf Jahre später fand man in Wirbeltieren Homologe zu den *Drosophila* Toll Proteinen, die sog. Toll-like Rezeptoren (Medzhitov *et al*, 1997). Inzwischen hat man 13 TLRs (11 im Menschen, 12 in der Maus) identifiziert. Die TLRs sind Typ I Transmembranproteine und gehören aufgrund ihrer Homologie in der Zytoplasmadomäne zur *Interleukin-1-Rezeptor/Toll-like Rezeptor-Superfamilie.* Die charakteristische zytoplasmatische TIR-Domäne ist essentiell für die Signalübertragung (O'Neill, 2000; O'Neill & Dinarello, 2000; Werling & Jungi, 2003). Die Extrazellulärdomäne ist direkt an der Erkennung der unterschiedlichen pathogenen Molekülstrukturen beteiligt und unterscheidet sich stark von der des IL-1 Rezeptors (Akira, 2003). Während der Extrazellulärteil des IL-1 Rezeptors aus drei Immunglobulindomänen besteht, besitzen TLRs 18-26 LRR von je 24-29 Aminosäuren Länge. TLRs werden im Gegensatz zu *Drosophila* Toll direkt von Fremdstrukturen aktiviert. (Bauer & Wagner, 2002; Beutler & Rietschel, 2003). Inzwischen sind eine Reihe verschiedener Liganden bekannt (siehe Abb. 2.3). Kürzlich wurde der erste chemisch identifizierte Ligand für murines TLR11, ein Profilin aus *Toxoplasma gondii*, beschrieben (Yarovinsky *et al*, 2005). Die Lokalisation der einzelnen TLRs korreliert in gewissem Ausmaß mit den molekularen Strukturen der einzelnen Liganden. Während TLR1, TLR2, TLR4 und TLR5 auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, werden TLR3, TLR7 und TLR9 von Nukleinsäure-Motiven aktiviert und sind in intrazellulären Kompartimenten zu finden (siehe Abb. 2.3). TLR9 wurde kürzlich im Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen und wird nach Stimulation mit CpG-enthaltener DNA in die endosomalen/lysosomalen Kompartimente rekrutiert (Latz *et al*, 2004).

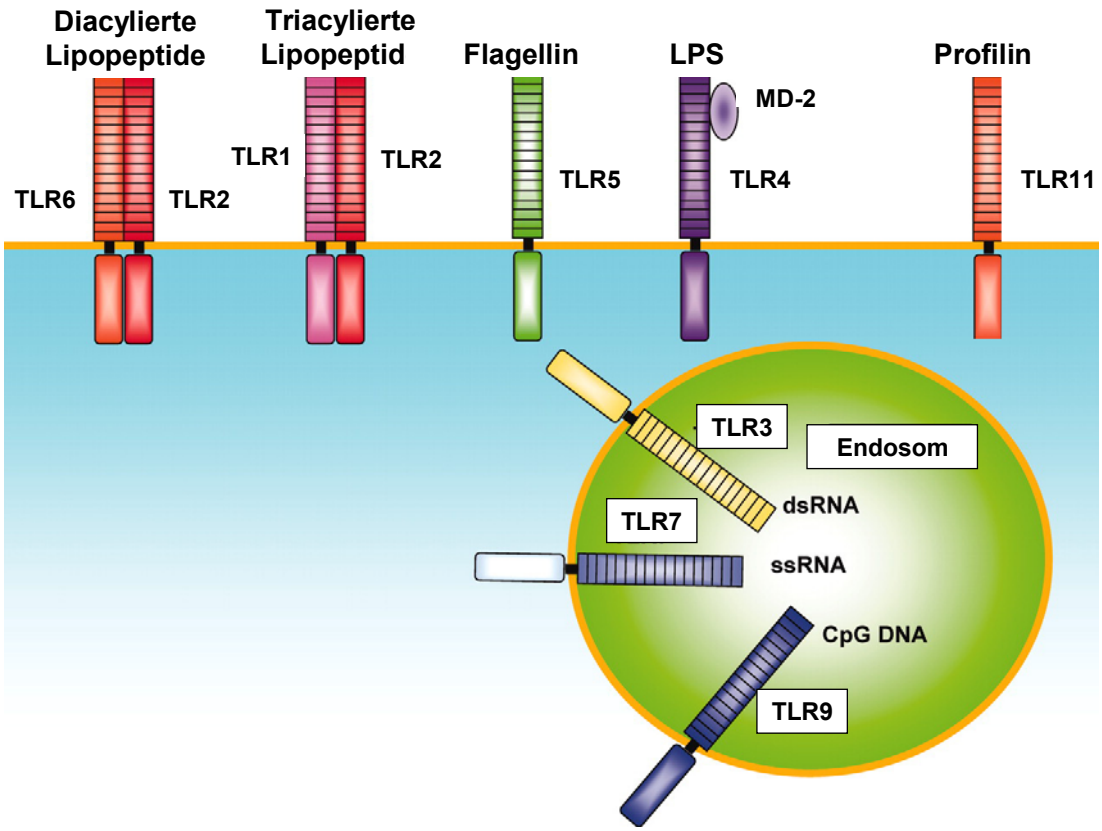


Abb. 2.3 : TLRs und ihre Liganden. TLR2 ist essentiell für die Erkennung von mikrobiellen Lipopeptiden und kooperiert mit TLR1 und TLR6, um zwischen diacylierten und triacylierten Lipopeptiden zu unterscheiden. TLR4, zusammen mit *myeloid differentiation-2* (MD-2), ist der Rezeptor für LPS. TLR9 ist ein Sensor für CpG DNA. Während TLR3 virale dsRNA erkennt, werden TLR7 und TLR8 von viraler ssRNA aktiviert. Die Familie der TLRs erkennt also ein sehr breites Spektrum unterschiedlicher pathogener Komponenten. Modifiziert nach (Takeda & Akira, 2005)

Nach der Aktivierung der TLRs kommt es zur Rekrutierung von Adaptormolekülen und zur Produktion proinflammatorischer Zytokine (siehe unter 2.6). Die Sekretion dieser Zytokine führt zu einer Stimulierung des Immunsystems und verteidigt gegen den eindringenden Mikroorganismus. Jedoch kann eine stark überschießende Produktion im schlimmsten Fall auch zur Sepsis bzw. zum septischen Schock führen (siehe auch 2.1) (Ulevitch & Tobias, 1999; Gutierrez-Ramos & Bluethmann, 1997).

2.6 TLR Signaltransduktion

2.6.1 MyD88-abhängige Signaltransduktion

Nach Stimulierung durch diverse Liganden induzieren TLRs verschiedene Transkriptionsfaktoren und aktivieren somit die Produktion mehrerer wichtiger Mediatoren der angeborenen Immunität, wie beispielsweise der Zytokine und der Chemokine.

Gleichzeitig setzt die Signalübertragung über TLR Moleküle frei, die für die Induktion der adaptiven Immunantworten unerlässlich sind. Diese bezeichnet man als kostimulatorische Moleküle. Der zuerst entdeckte TLR-Signalweg (dieser trifft für alle TLRs zu, außer TLR3) läuft über das Adaptormolekül *myeloid-differentiation-primary-response-gene 88* (MyD88), welches über seine TIR-Domäne mit den verschiedenen TLRs assoziiert (Abb. 2.4). Speziell in die Signaltransduktion über TLR2 und TLR4 ist noch ein anderer Adaptor mit TIR Domäne, *TIR domain containing adaptor protein* (TIRAP), involviert (Fitzgerald *et al*, 2001; Horng *et al*, 2001). Dieser interagiert zum einen mit der TIR Domäne von TLR2 bzw. TLR4 und zum anderen mit MyD88. Die N-terminale *death domain* (DD) von MyD88 bindet an die DD von *IL-1R associated kinase 4* (IRAK-4), eine Serine-Threonin Kinase (Janssens & Beyaert, 2002). IRAK-1 wird unabhängig von MyD88 zu dem Rezeptor rekrutiert und durch IRAK-4 phosphoryliert (Takeda & Akira, 2005). Die Serin-Threonin-Kinasen dissoziieren dann von dem Rezeptorkomplex ab und interagieren mit *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6* (TRAF-6) (Arch et al, 1998). TRAF-6 assoziiert anschließend mit *TAK1 binding protein-2* (TAB-2), dieser Komplex aktiviert *TGF β activated kinase-1* (TAK-1), IκB Kinasen und folglich den Transkriptionsfaktor NF-κB (Akira, 2003; Dunne & O'Neill, 2003; Janeway, Jr. & Medzhitov, 2002a). NF-κB reguliert die Transkription vieler insbesondere für die Entzündung und Immunantwort wichtiger Gene. So enthalten z.B. die Gene für die Zytokine IL-1β, IL-6 und IL-8 oder für die kostimulierende Moleküle B7.1 und B7.2 κB-Erkennungssequenzen in ihren Promotoren (Ghosh *et al*, 1998; Karin & Ben Neriah, 2000).
Die Signaltransduktion unterhalb von TRAF-6 kann auch in andere Richtungen verlaufen. Neben der Aktivierung von IκB Kinasen können auch *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)s, wie beispielsweise *c-Jun NH_2-terminal kinase* (JNK) induziert werden (Jones *et al*, 2001). Kürzlich konnten zwei Gruppen zeigen, dass auch die Transkriptionsfaktoren *IFN regulatory factor* (IRF)-5 und IRF-7 auf dem MyD88-abhängigen Weg aktiviert wird (Honda *et al*, 2005; Takaoka *et al*, 2005).

2.6.2 MyD88-unabhängige Signaltransduktion

Studien mit MyD88 defizienten Mäusen haben gezeigt, dass die Signaltransduktion über TLR4 nicht ausschließlich von MyD88 abhängt. MyD88 defiziente Makrophagen zeigten auf Stimulation mit LPS eine Induktion Interferon (IFN) -abhängiger Gene wie z.B. *IFN-inducible protein 10* (IP-10), ein CXC Chemokin, *immunoresponsive gene 1* (IRG1) und *glucocorticoid-attenuated response gene 16* (GARG16). Auch die Signaltransduktion über TLR3 scheint nicht von MyD88-abhängig zu sein. Poly(I-C) (ein synthetisches Analogon zu dsRNA) stimulierte MyD88 defiziente Makrophagen zeigten keine abgeschwächte Reaktion im

Vergleich zu den Makrophagen von Wild-Typ (WT) Mäusen. Außerdem sind Viren und virale dsRNA potente Aktivatoren von IRF-3, welches IFN-β-abhängige Gene induziert. Diese Studien legen die Vermutung nahe, dass zumindest für TLR3 und TLR4 ein MyD88-unabhängiger Signalweg existieren muss (Abb. 2.4).

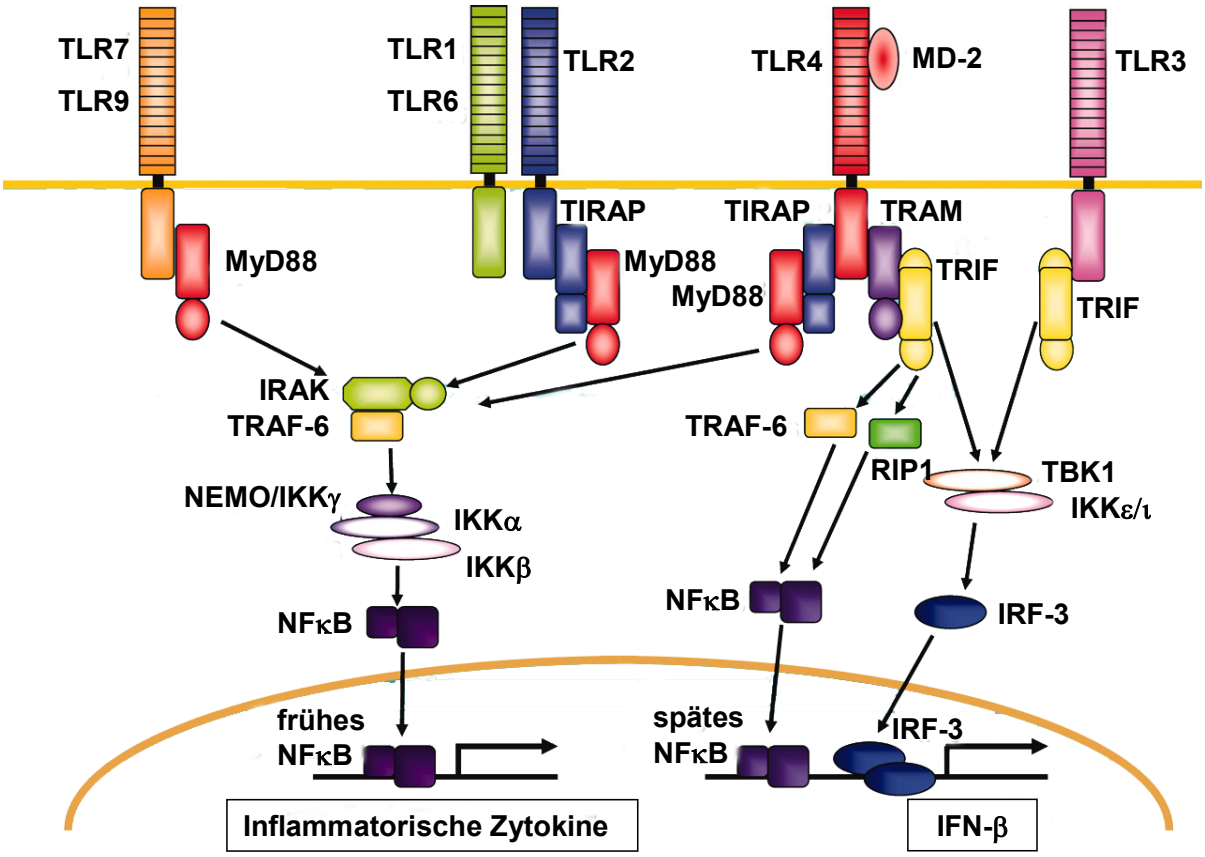


Abb. 2.4: Signaltransduktion über TLR. Die Signaltransduktion über TLRs geht von ihrer TIR Domäne aus. MyD88, ein Adaptormolekül mit TIR-Domäne, assoziiert mit der zytoplasmatischen TIR-Domäne der TLRs und rekrutiert IRAK zum Rezeptorkomplex. IRAK aktiviert dann TRAF-6, und dies wiederum den IκB Kinasen (IKK) Komplex (welcher aus IKKα, IKKβ und NF-κB *essential modulator* (NEMO)/IKKγ besteht). Der IκB Kinasen Komplex phosphoryliert IκB, dies führt zur Translokation von NFκB und induziert somit die Produktion von proinflammatorischen Genen. TIRAP, ein zweites Adaptormolekül mit TIR Domäne, spielt eine Rolle in der MyD88-abhängigen Signaltransduktion über TLR2 und TLR4. In der Signaltransduktion über TLR3 und TLR4 kommt es zur Induktion IFN-β–abhängiger Gene über die MyD88-unabhängige Aktivierung von IRF-3. Ein dritter Adaptor mit TIR-Domäne, TRIF, ist essentiell für die MyD88-unabhängige Signaltransduktion. Untypische IκB Kinasen, wie IKKι/IKKε und TBK1, führen zur Aktivierung von IRF-3 unterhalb von TRIF. Ein viertes Adaptormolekül mit TIR Domäne, TRAM, ist nur bei der MyD88-unabhängigen bzw. TRIF-abhängigen Signaltransduktion über TLR4 beteiligt.
Modifiziert nach (Takeda & Akira, 2005)

Yamamoto *et al.* (Yamamoto *et al*, 2002) identifizierte 2002 den Adaptor *TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β* (TRIF), gleichzeitig von Oshiumi *et al.* (Oshiumi *et al*, 2003a) als *TIR domain containing adaptor molecule 1* (TICAM-1) publiziert, welcher mit IRF-

3 assoziiert und den IFN-β Promotor induziert. TRIF scheint essentiell für die MyD88-unabhängige Signaltransduktion über TLR3 und TLR4 zu sein und ist der bislang einzig identifizierte Adaptor für TLR3. Wegen der relativ schlechten Interaktion zwischen TRIF und TLR4 wurde nach einem weiteren Adaptor gesucht, der die Verbindung zwischen diesen beiden herstellt. Wiederum wurde von zwei Gruppen gleichzeitig der Adaptor *TRIF related adaptor molecule* (TRAM) bzw. *TIR domain containing adaptor molecule 2* (TICAM-2) identifiziert (Oshiumi *et al*, 2003b; Yamamoto *et al*, 2003). Dieser ist spezifisch für die MyD88-unabhängige Signaltransduktion über TLR4 und wird weder von TLR3 noch von einem anderen TLR benutzt. TRAM assoziiert mit IRF-3 und führt zusammen mit TRIF zur Translokation von IRF-3 in den Nukleus. IRF-3 ist ein IRF Transkriptionsfaktor, welcher das *interferon stimulated response element* (ISRE) bindet und Typ-I Interferone induziert (Au *et al*, 1995).

Weitere Untersuchungen in MyD88 defizienten Mäusen zeigten, dass diese auf immunstimulatorische Moleküle wie Peptidoglykane, Lipoproteine, CpG DNA, Flagellin und Imidazoquinoline nicht reagierten, jedoch auf LPS Stimulierung NFκB aktivierten, wenn auch verspätet verglichen mit der NFκB Induktion in WT Mäusen. Die MyD88-unabhängige Signalkaskade ist also neben Aktivierung von IRF-3 für spät aktiviertes NFκB verantwortlich. Dieser Signalweg wird durch eine Interaktion von TRIF mit TRAF-6 ausgelöst. Unterhalb von TRAF-6 scheint die Signalkaskade ähnlich der oben beschriebenen MyD88-abhängigen Kaskade abzulaufen. Die MyD88-unabhängige späte Produktion NFκB-abhängiger Gene scheint bis jetzt spezifisch für TLR4 zu sein (Akira & Hoshino, 2003).

2.7 Bedeutung der TLRs in der Sepsis

Mit der Entdeckung der TLRs (Poltorak *et al*, 1998; Takeuchi *et al*, 1999) wurden im Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge bei der Sepsis erhebliche Fortschritte gemacht. Man nimmt heute an, dass bei einer mikrobiell ausgelösten Sepsis bakterielle Bestandteile die Immunzellen des Wirtes über die TLRs stimulieren. Diese zunächst positive und notwendige Reaktion gerät dann außer Kontrolle und führt zu einer generellen Überstimulierung, die in einem Multiorganversagen enden kann (siehe 2.1). Gram-positive wie auch Gram-negative Bakterien sind die Hauptauslöser der Sepsis. Während TLR2 Bestandteile Gram-positiver Bakterien wie Peptidoglykane, Lipopeptide und LTA erkennt, ist TLR4 der Rezeptor für LPS, dem Hauptbestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien. TLR2 und TLR4 stehen also bei Gram-positiver und Gram-negativer Sepsis als Signal-übertragende Rezeptoren im Mittelpunkt (Abreu & Arditi, 2004; Cohen, 2002).

2.8 TLR4/MD-2

Lange Zeit wurde nach den genauen molekularen Mechanismen der zellulären LPS-Erkennung gesucht. Wichtige Erkenntnisse für das Verständnis von LPS-Effekten brachte die Entdeckung des *lipopolysaccharide binding protein* (LBP) (Schumann *et al*, 1990) und des Zelloberflächen-Glykoproteins CD14 (Schumann *et al*, 1990; Wright *et al*, 1990), welches den LPS/LBP-Komplex bindet. CD14 existiert im Organismus in zwei Formen, als membranständiger Glykophosphatidylinositol (GPI) verankerter Rezeptor und als lösliches Protein. Doch weder das Akute-Phase-Protein LBP, noch das GPI verankerte CD14 kamen aufgrund der fehlenden intrazellulären Domäne für eine Signaltransduktion in Frage (Haziot *et al*, 1988). Lange Zeit waren zwei Mausstämme bekannt, die nicht auf LPS reagierten, aber bei LBP und CD14 keine Defekte aufwiesen. 1998 zeigte Poltorak *et al.*, dass das Gen, welches bei LPS-insensitiven C3H/HeJ- und LPS-insensitiven C57BL/10ScCr -Mäusen defekt war, zu einer Gruppe von Genen gehörte, die ausgeprägte Homologie zum Toll-Gen von *Drosophila* aufwiesen (Poltorak *et al*, 1998). In der Folge wurde die Funktion dieses Gens als LPS-Rezeptor aufgeklärt und das Gen als TLR4 benannt. Inzwischen gilt TLR4 aufgrund vieler verschiedener Untersuchungen als LPS-Rezeptor (Arbour *et al*, 2000; Hirschfeld *et al*, 2000; Takeuchi *et al*, 1999; Tapping *et al*, 2000).

Für die LPS-Signaltransduktion über TLR4 sind noch weitere Moleküle notwendig (Abb. 2.5). LPS, der Hauptbestandteil der Zellwände Gram-negativer Bakterien, wird von LBP gebunden (Schumann *et al*, 1990) und überträgt LPS auf CD14 (Goyert *et al*, 1988; Wright *et al*, 1990). CD14 überträgt anschließend LPS auf den TLR4/MD-2 Rezeptorkomplex, wodurch TLR4 aktiviert wird und es zur Stimulierung der MyD88-abhängigen und der MyD88-unabhängigen Signalkaskaden kommt (siehe 2.6). Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass TLR4 dimerisiert und als Komplex zusammen mit dem MD-2 Molekül vorliegt (siehe Abb. 2.5) (Akashi *et al*, 2000; Akashi *et al*, 2001; Kimoto *et al*, 2003; Ozinsky *et al*, 2000). Das Molekül MD-2 wurde identifiziert, nachdem man feststellte, dass Zelllinien, die mit TLR4 transfiziert wurden, nicht auf LPS reagierten. Man suchte also nach weiteren Molekülen, die für die LPS Signaltransduktion essentiell waren. Shimazu *et al.* entdeckten MD-2 (Shimazu *et al*, 1999).

MD-2, ein Cystein-reiches Glykoprotein mit drei bekannten Glykoformen zwischen 20 und 30 kDa, ist mit der extrazellulären Domäne des TLR4 assoziiert und stellt einen essentiellen Bestandteil des LPS-Rezeptor Komplexes dar (Schromm *et al*, 2001; Shimazu *et al*, 1999; Thompson *et al*, 2003). Inzwischen ist bekannt, dass MD-2 das entscheidende Molekül im LPS-Rezeptor Komplex darstellt (Kimoto *et al*, 2003; Nagai *et al*, 2002), da nur MD-2 LPS binden kann (Viriyakosol *et al*, 2000). Diese Bindung wird allerdings durch die Anwesenheit von TLR4 wesentlich verstärkt (Visintin *et al*, 2003). TLR4 alleine hingegen scheint kein LPS binden zu können (Visintin *et al*, 2003). Auf der Zelloberfläche müssen also TLR4 und MD-2

als Komplex exprimiert sein, der sich vermutlich bereits im Endoplasmatischen Retikulum bildet (Latz *et al*, 2002; Visintin *et al*, 2003). TLR4 gelangt in MD-2 defizienten Zellen, im Gegensatz zu WT Zellen, nicht an die Zelloberfläche und verlässt den Golgi-Apparat nicht. MD-2 scheint somit auch Chaperoneigenschaften zu besitzen. Nicht LPS gebundenes MD-2 verliert unter physiologischen Bedingungen sehr rasch die biologische Aktivität und scheint große inaktive Komplexe zu formen (Kennedy *et al*, 2004). Aufgrund seiner sieben Cystein Reste bildet MD-2 über Disulfidbrücken verknüpfte Oligomere, die jedoch nicht in der Lage sind, LPS zu binden (Mullen *et al*, 2003). Nur monomeres MD-2 bindet LPS (Re & Strominger, 2002). Wird nun LPS auf den Komplex aus TLR4/MD-2 übertragen, kommt es zur Aktivierung von TLR4. Dies führt zur Bildung von großen TLR4 Aggregaten (Visintin *et al*, 2003), vermutlich in *rafts*, die dann in die Zelle internalisiert werden (Latz *et al*, 2002) und im wesentlichen über eine MyD88-abhängige und eine MyD88-unabhängige Signalkaskade zur Aktivierung von NFκB und IRF-3 führen.

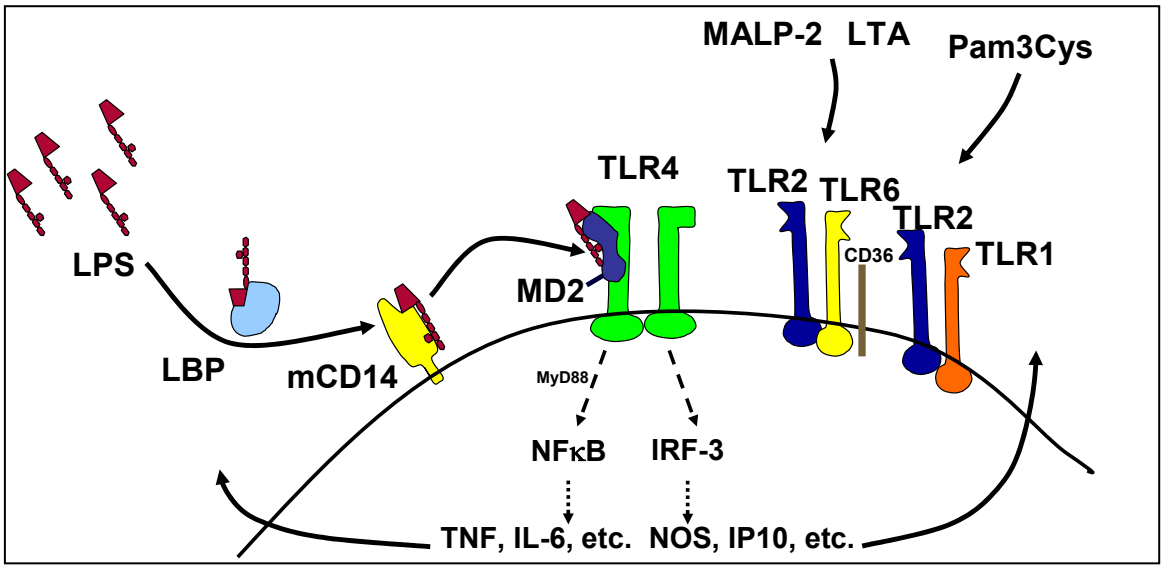


Abb. 2.5: Signaltransduktion über TLR2 und TLR4. LPS wird von den Serumproteinen LBP und CD14 auf den TLR4/MD-2 Komplex übertragen. Es kommt zur Stimulierung von TLR4 und zur Aktivierung zweier Signalkaskaden, der MyD88-abhängigen und der MyD88-unabhängigen Signalkaskade. TLR2 wird von vielen verschiedenen Molekülen aktiviert, wie beispielsweise di- und triacylierte Lipopeptide oder LTA. TLR2 assoziiert mit zahlreichen anderen PRRs, mit den TLRs 2 und 6 oder/und beispielsweise mit CD36.

2.9 TLR2

TLR2 erkennt von allen TLRs das breiteste Spektrum an pathogenen Molekülen. TLR2 fungiert z.B. als Sensor für Lipoproteine und Lipopeptide aus verschiedenen Pathogenen, Peptidoglykane und LTA aus Gram-positiven Bakterien, Lipoarabinomannan aus Mykobakterien und Zymosan aus Pilzen (Brightbill *et al*, 1999; Hirschfeld *et al*, 1999; Lien *et al*, 1999; Schwandner *et al*, 1999; Underhill *et al*, 1999b; Underhill *et al*, 1999a). Das

Potential von TLR2, diverse Liganden zu erkennen, lässt sich gegenwärtig durch zwei Mechanismen erklären.

Zum einen bildet TLR2 Heterodimere mit anderen TLRs, speziell mit TLR1 und TLR6. Beide sind dem TLR2 in ihrer Struktur sehr ähnlich. Makrophagen von TLR6 defizienten Mäusen reagieren zwar nicht auf diacetylierte Lipopeptide, jedoch zeigen sie eine starke proinflammatorische Reaktion nach Stimulation mit triacetylierten Lipopeptiden (Takeuchi *et al*, 2001). Im Gegensatz dazu zeigen TLR1 defiziente Makrophagen eine normale Reaktion auf diacetylierte Lipopeptide und eine deutlich schwächere Reaktion auf triacetylierte Lipopeptide (Takeuchi *et al*, 2002). Demnach leitet TLR2 ein Signal, je nach Acetylierungsgrad des Liganden, in Verbindung mit TLR1 oder TLR6 weiter (Takeda *et al*, 2002). TLR2 assoziiert auch mit anderen Rezeptoren, welche sich in der Struktur von TLR2 vollkommen unterscheiden. So kooperiert TLR2 beispielsweise mit Dectin-1, einem Rezeptor für β-Glukane beispielsweise in der Zellwand von Pilzen, oder mit dem Scavenger Rezeptor CD36 (siehe auch 2.3) (Hoebe *et al*, 2005; Viriyakosol *et al*, 2005).

TLR2 assoziiert also mit anderen Rezeptoren, die entweder in ihrer Struktur ähnlich dem TLR2 sind (TLR1 und TLR6) oder auch vollkommen verschieden (Dectin-1). Durch diese verschiedenen Assoziationen ist es also für TLR2 möglich, ein so breites Spektrum an unterschiedlichen Strukturen zu erkennen.

2.10 Lösliche Rezeptoren

Lösliche Rezeptoren gehören zu einer Gruppe regulatorischer Moleküle, die bei bestimmten Krankheiten eine wichtige Rolle spielen (Heaney & Golde, 1996; Heaney & Golde, 1998). Entweder werden sie durch einen proteolytischen Mechanismus direkt aus membranständigen Rezeptoren gebildet oder sie entstehen durch alternatives Spleißen. Oft kommt es beim Vorgang des alternativen Spleißens zu einem *frameshift*, der zur Ausbildung eines neuen Stopcodons führt. Der hydrophobe Membrananker kann dann bei diesem Vorgang verloren gehen (Downes, 2004; Stamm *et al*, 2005). Über die genaue Regulation ist noch wenig bekannt, sie erfolgt vermutlich über Pseudogene. Eine biologische Funktion von löslichen Rezeptoren ist beispielsweise das Neutralisieren von zirkulierenden Liganden (Mohler *et al*, 1993). Die Extrazellulärdomänen des IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1RI) und des IL-1 Rezeptor Typ II (IL-1RII) kommen auch in löslicher Form in der Zirkulation vor und greifen negativ regulierend in das IL-1 Rezeptor System ein (Heaney & Golde, 1996). Der lösliche IL-1RII, welcher IL-1β nahezu irreversibel bindet, spielt hierbei sicherlich die Hauptrolle. Weitere lösliche Zytokinrezeptoren, denen durch Komplexierung und somit Inaktivierung des Liganden eine negative Regulation nachgewiesen wurde, sind z.B. die löslichen TNF-

Rezeptoren p55 und p75. Dieses Prinzip der negativen Regulation wird auch im Rahmen der anti-TNF-Therapie angewendet (siehe unten). Ein weiterer Mechanismus für lösliche Rezeptoren wird bei Betrachtung des löslichen IL-6 Rezeptors sichtbar. Der Komplex aus löslichem IL-6 Rezeptor und IL-6 kann in Zellen, die gp130 exprimieren, eine Signal-Übertragung induzieren, obwohl die Zelle selbst keinen IL-6 Rezeptor besitzt (Taga *et al*, 1989). Des Weiteren können lösliche Rezeptoren auch eine positive Regulation bewirken, beispielsweise konnte dies für den löslichen IL-4 Rezeptor gezeigt werden, der nach Bindung des Liganden dessen Halbwertszeit um ein zwanzigfaches verlängert. Die IL-4 vermittelte IgE Ausschüttung wird durch die längere Präsenz des Liganden ebenfalls erhöht (Sato *et al*, 1993). Alle aufgeführten, natürlich vorkommenden löslichen Rezeptoren tragen somit zur Feinregulation im Zusammenspiel von Effektor- und Zielzellen bei.

Bis jetzt ist über das Vorhandensein und über die Funktion löslicher TLRs wenig bekannt. Iwami *et al*. konnten eine alternative Spleißform des TLR4 in der murinen Makrophagen Zelllinie RAW 264.7 nachweisen (Iwami *et al*, 2000). Weiterhin zeigten die Autoren eine inhibitorische Rolle dieses löslichen TLR4s auf die LPS-induzierte TNF Produktion in RAW 264.7. Auch ein löslicher TLR2 wurden von LeBouder *et al*. in der Muttermilch entdeckt. Durch lösliches TLR2 konnte die Antwort auf Gram-positive Keime kontrolliert und mit rekombinanten löslichen Rezeptoren die Antwort auf einen TLR2 Stimulus blockiert werden (LeBouder *et al*, 2003). Es gibt demnach also erste Hinweise, dass lösliche TLRs natürlich vorkommen und diese auch eine negative regulatorische Eigenschaft besitzen. Demnach könnten lösliche TLRs in der Pathophysiologie der Sepsis eine Rolle spielen und eventuell auch einen neuen therapeutischen Ansatz darstellen. Ein ähnliches therapeutisches Konzept, welches bei manchen entzündlichen Erkrankungen Erfolge verzeichnet, ist die anti-TNF-Therapie. In einer Vielzahl von infektiösen und entzündlichen Erkrankungen wurden erhöhte TNF-Serumspiegel beschrieben. Für Patienten mit rheumatoider Arthritis (Cope *et al*, 1992), Lupus erythematodes (Aderka *et al*, 1993), Tumoren (Aderka *et al*, 1991), Sepsis (Schroder *et al*, 1995) und HIV (Hober *et al*, 1996b; Hober *et al*, 1996a) ist dies belegt und gilt als diagnostischer Marker.

Deshalb versuchte man mit den unterschiedlichsten Strategien das Schlüsselmolekül TNF zu blockieren. Zur gezielten anti-TNF-Therapie wurden mehrere Strategien verfolgt. Das Komplexieren von löslichem TNF zeigte sich prinzipiell als eines der effizientesten Methoden. Ein Beispiel für ein Molekül, welches lösliches TNF komplexiert, ist Etanercept (Enbrel®). Dieses Fusionsprotein der Firma Wyeth besteht aus dem Fc-Teil eines humanen IgG1 und der Extrazellulärdomäne des humanen p75TNF Rezeptors. Die durchschnittliche Halbwertszeit des löslichen Rezeptors wird durch die Bindung an den Fc-Teil enorm verlängert (ca. zwei Wochen) und der dimerisierte Rezeptor weist eine 50 bis 1000-fach höhere Affinität zu TNF auf als das Monomer. Dieser lösliche humane p75TNFRezeptor wird

subkutan bzw. intravenös appliziert. Neben Etanercept kam eine Reihe anderer strukturell unterschiedlicher, aber funktionell ähnlicher Moleküle auf den Markt. Trotz hoher Erwartungen zeigte sich allerdings kein Nutzen in der Behandlung der Sepsis (Butty *et al*, 2003) und der Multiplen Sklerose (Schwid & Noseworthy, 1999). Im Bereich der rheumatoiden Arthritis und des Morbus Crohn jedoch ist die anti-TNF-Therapie eine neue und sehr effektive Behandlungsmethode, da durch die Blockade dieses Zytokins auch die Freisetzung von IL-1 und IL-6 vermindert und, laut neuerer Daten, die verloren gegangene Supressorfunktion von regulatorischen T-Zellen wieder hergestellt wird (Ehrenstein *et al*, 2004).

Lösliche Rezeptoren stellen also eine wichtige, relativ neue Klasse an effizienten möglichen Therapeutika dar. Jedoch müssen die molekularbiologischen Grundlagen auf der Rezeptor-Ligand Ebene vollkommen verstanden werden, bevor man sich von löslichen Rezeptoren eine klinische Relevanz erhoffen kann.

2.11 Ziele

Ziel der Dissertation war es, mit löslichen TLRs die überschießende Reaktion der angeborenen Immunität während des Verlaufs einer bakteriellen Sepsis pharmakologisch zu kontrollieren. Da TLR2 und TLR4 in der Signaltransduktion von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien eine essentielle Rolle spielen, sollte mit löslichem TLR2 und löslichem TLR4 diese überschießende proinflammatorische Reaktion kontrolliert werden. Falls lösliche TLRs, die nur aus dem Extrazellularteil von TLR bestehen, die Fähigkeit besitzen, deren Liganden zu binden, könnten diese als Konkurrenzprodukte zu den membranständigen TLRs fungieren und somit die starke Reaktion der angeborenen Immunität verhindern (Abb. 2.6).

Um den Einfluss dieser löslichen TLRs auf die proinflammatorische Reaktion zu testen, sollten rekombinante Fusionsproteine aus dem Extrazellularteil von TLR2 bzw. TLR4 und humanem IgGFc hergestellt und biochemisch charakterisiert werden. Die Wirkung der Fusionsproteine sollte zunächst *in vitro* und bei positivem Ergebnis *in vivo* untersucht werden.

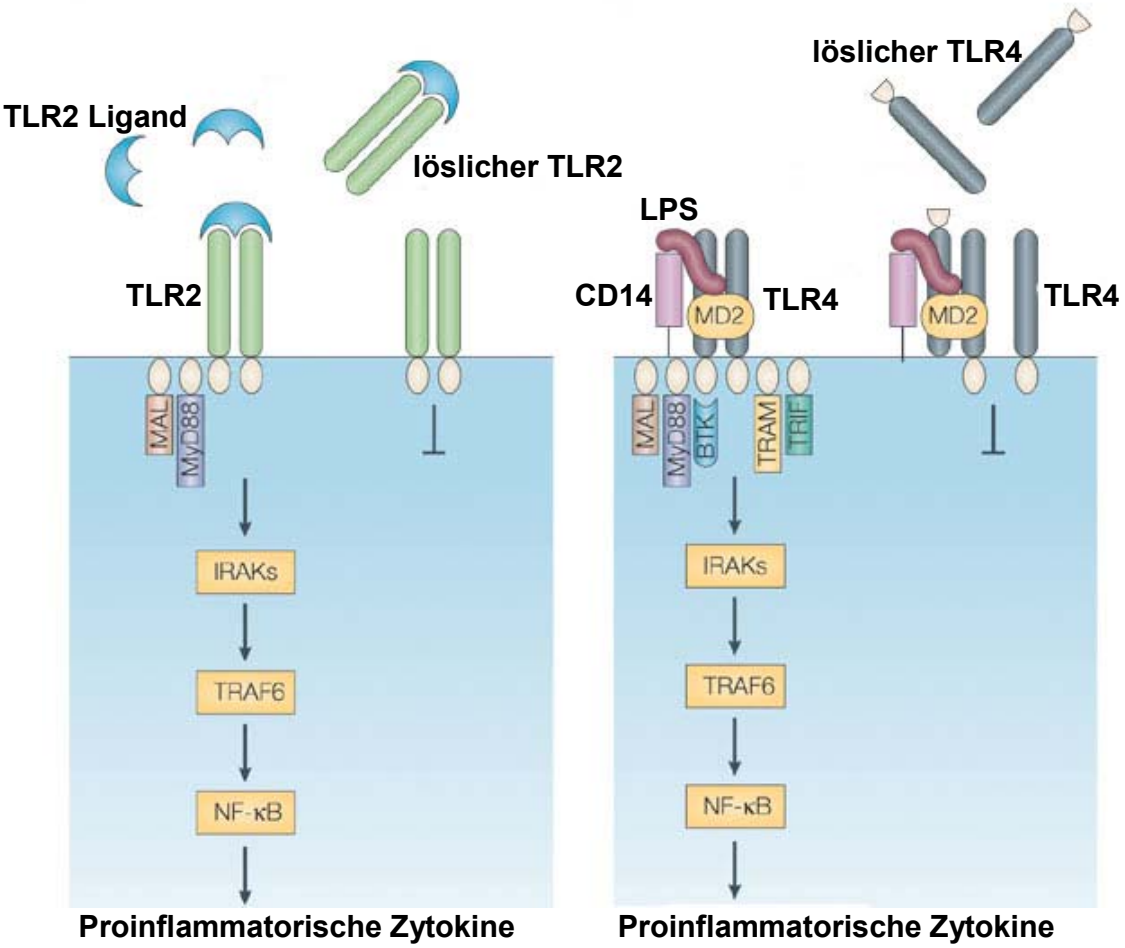


Abb. 2.6: Hypothese zur Beeinflussung der Signaltransduktion über TLR2 bzw. 4 mit löslichen TLRs. Lösliche TLRs könnten als Konkurrenzprodukt zu den membranständigen TLRs fungieren und somit die Signaltransduktion über TLRs hemmen bzw. kontrollieren.
Modifiziert nach (Liew *et al*, 2005a)

Ein weiterer Themenkomplex sollte sich mit der Frage beschäftigen, inwiefern sich die Expression von TLRs auf Zellen des peripheren Blutes bei Patienten mit Sepsis von gesunden Kontrollen unterscheidet. Erste Untersuchungen (von Dr. Christian Huber, Innere Medizin I, Uniklinikum Regensburg) an Proben von Patienten mit Sepsis und gesunden Kontrollen wiesen darauf hin, dass beim Menschen in der Sepsis sowohl die TLR-mRNA, als auch die Antigen-Dichte von TLRs auf der Zelle erhöht sein könnten. Unklar bleibt jedoch, ob eine erhöhte Expressionsdichte der TLRs auf der Oberfläche von Zellen des peripheren Blutes auch eine verstärkte Bereitschaft des Organismus bedingt, überschießend auf bakterielle Zellwandbestandteile zu reagieren. Es sollte deshalb weiter untersucht werden, ob sich die TLR Oberflächendichte auf Stimulation mit bakteriellen Zellwandbestandteilen (z.B. LPS) verändert.

Außerdem sollten zur Etablierung eines ELISA Testsystems für lösliches TLR monoklonale und polyklonale Antikörper gegen lösliches TLR2 und lösliches TLR4 produziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Geräte

Analysenwaage,	
Sartorius analytic A120 S	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Technomara, Fernwald
Biometra Fastblot B44	Biometra, Göttingen
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Densitometer	Molecular Dynamics, Krefeld
Durchlichtungsmikroskop	E. Leitz, Wetzlar
Econo-Pumpe	Bio-Rad, München
Econo-Säule	Bio-Rad, München
Elektrophoreseapparaturen (Agarosegel)	Biometra, Göttingen; BioRad, München
EI9001-XCELL II Mini Cell	Novex, San Diego, USA
ELISA-Reader	MWG-Biotech, Ebersberg
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Megafuge Zentrifuge	Heraeus, Hanau
Mikroskope	Leica, Bensheim
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
PCR-Thermocycler Tristar	Biometra, Göttingen
pH-Meter	Wiss. Tech. Werkst., Weilheim
Phosphoimager Typhoon 9200	Amersham, Braunschweig
Sterilbank LaminAir HSB 2472 S	Sepatech , Osterode
Sterilbänke	Heraeus, Hanau
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen	Heraeus, Hanau; Eppendorf, Hamburg
Waage Sartorius excellence E1200 S	Sartorius, Göttingen
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn

3.1.2 Verbrauchsmaterial und Plastikartikel

Centricon Säulen	
(Centricon YM-10 concentrators)	Millipore, Schwalbach
Einmalpipetten	Costar, Cambridge, USA

ELISA-Platten	Greiner, Nürtingen
Hyperfilm	Amersham, Braunschweig
Kryoröhrchen	Nunc, Naperville
Li-heparin Röhrchen	Sarstedt, Nürnbrecht
Nitrozellulosemembranen (Optitran BA-S 83)	Schleicher & Schuell, Dassel
PCR Tubes 0,5 ml	Biozym, Oldendorf
Petrischalen	Falcon, Heidelberg
Polystyrolröhrchen für Durchflusszytometer	Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
Transwell Millicell Culture Plate Inserts 12 mm	Millipore, Schwalbach
Whatman Filterpapier	Biometra, Göttingen
Zellkulturflaschen	Costar, Cambridge, USA
Zellkulturplatten (6, 24, 96 Vertiefungen)	Costar, Cambridge, USA
Zellkulturschalen	Costar, Cambridge, USA
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Falcon, Heidelberg

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

0,9% NaCl	Braun, Melsungen
Affi-Gel Protein A	Bio-Rad, München
Biotinhydrazid	Pierce, Perbio, Bonn
Chelatbindende Sepharose	Amersham Biosciences, Freiburg
ECL Lösungen A+B	Amersham Biosciences, Freiburg
FACS Lyselösung	Becton Dickinson, San Jose, USA
Titermax Adjuvans	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Fugene 6 Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
IPTG	Biomol, Hamburg
jetPEI Transfektionsreagenz	Biomol, Hamburg
LBP (Maus)	Alexis Biochemicals, Grünberg
LPS aus *Salmonella abortus equi* S-Form	Alexis Biochemicals, Grünberg
LPS aus *Salmonella minnesota*	Sigma, Steinheim
LTA aus *Staphylococcus aureus*	Geschenk von Dr. T. Hartung, Universität Konstanz

NBT/BCIP Tabletten	Roche, Mannheim
Ni-NTA-Agarose (Probond)	Invitrogen, Karlsruhe
Polyethylenglycol 1500	Roche, Mannheim
Protein G-Sepharose	Amersham, Uppsala, Schweden
Quantum 27 R-PE „microbeads“	Bangs Laboratories, Fishers, USA
sCD14 (Maus)	Alexis Biochemicals, Grünberg
Streptavidin Sepharose	Amersham Biosciences, Freiburg
Superfect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
TMB	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
X-Gal	Biomol, Hamburg

Alle nicht aufgeführten Lösungsmittel (p.A.) wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Die nicht aufgeführten Feststoffe (p.A.) wurden von Sigma (Deisenhofen) erhalten.

3.1.4 Puffer und Lösungen

Biotin-Hydrazid-Lösung	50 mM Biotin-Hydrazid in DMSO
Biotin-Kopplungspuffer	0,1 M CH_3COONa/CH_3COOH pH 5,5
ELISA- Beschichtungspuffer	50 mM $NaHCO_3$ pH 9.2
ELISA-Blockierlösung	5% BSA in Waschpuffer
ELISA-Waschpuffer	0,05% Tween 20 in PBS
ELISA-Stopplösung	1 M Schwefelsäure
Elutionspuffer- Protein A Chromatographie	0.1 M Glycin/HCl Puffer pH 4
Elutionspuffer-	10 mM Imidazol

Chelatbindende Sepharose	in 50 mM Tris/HCl pH 8
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid 0,04 % in aqua bidest.
Ladepuffer DNA (5x)	50 mM Tris/HCl pH 7,8 1% SDS (20%) 50 mM EDTA (0,5 M) pH 8,0 40% Glycerin 0,1% Bromphenolblau in aqua bidest.
Lämmli-Probenpuffer (6x)	120 mM Tris/HCl pH 8,8 6% SDS 2% β-Mercaptoethanol 50% Glycerin 0,2% Bromphenolblau
Natrium-*meta*- Perjodat-Lsg.	20 mM Natrium-*meta*-perjodat in Biotin-Kopplungspuffer
NBT/BCIP-Färbelösung	1 Tablette (Roche) folgender Zusammensetzung: 4 mg NBT 1,9 mg BCIP 100 mM Tis/HCl pH 9,5 50 mM $MgSO_4$ in 10 ml destilliertem Wasser gelöst
PBS	150 mM NaCl 8 mM K_2HPO_4 2 mM KH_2PO_4 pH 7,3
Protease Xa Verdaupuffer	100 mM NaCl 50 mM Tris/HCl pH 8 1 mM $CaCl_2$

HBS (2x)	16 g/l NaCl 0.74 g/l KCl 0.21 g/l Na_2HPO_4 10 g/l Hepes pH 7.1
TAE (50x)	2 M Tris 250 mM CH_3COONa/CH_3COOH pH 7,8 50 mM EDTA in aqua bidest.
Trypanblaulösung	0,2% (w/v) Trypanblau in 0,9%iger NaCl-Lösung
Western Blot- Anodenpuffer A	0.3 M Tris pH 10.4 20% Methanol in aqua bidest.
Western Blot- Anodenpuffer B	25 mM Tris pH 10.4 20% Methanol in aqua bidest.
Western Blot- Kathodenpuffer C	5.4 mM ε-Amino-n-Capronsäure pH 7.6 20% Methanol in aqua bidest.
Western Blot- Blockierlösung	5% Magermilchpulver 0,02% Triton X in PBS
Western Blot- Waschlösung	0,02% Triton X In PBS
X-Gal-Stammlösung	20 mg/ml X-Gal in N,N-Dimethylformamid

3.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze, Antibiotika

Accutase	Gibco-BRL, Eggenstein
Dulbecco`s modified eagle medium (DMEM)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
FCS	Sigma, Deisenhofen
Glutamin	Seromed-Biochrom, Berlin
Hygromycin	Roche, Mannheim
Insect Xpress medium	BioWhittaker, Cambrex, Verviers, Belgien
RPMI 1640	PAN Biotech, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco's PBS	Biochrom, Berlin

3.1.6 Antikörper und Kopplungsreagenzien

monoklonale:

Maus-Anti-CD14-APC	Becton-Dickinson, San Jose, USA
Maus-Anti-Flag M2	Sigma, Deisenhofen
Maus-Anti-Flag M2-Biotin	Sigma, Deisenhofen
Maus-Anti-His	Qiagen, Hilden
Maus-Anti-human TLR2 (TL2.1)	Ebioscience, San Diego, USA
Maus-Anti-human TLR4 (HTA 125)	Ebioscience, San Diego, USA
Ratte-Anti-Maus TLR4/MD-2 (MTS 510)	Alexis Biochemicals, Grünberg

polyklonale:

Ziege-Anti-Maus-IgG-AP	Sigma, Deisenhofen
Ziege-Anti-Maus-Peroxidase	Sigma, Deisenhofen
Ziege-Anti-Kaninchen-AP	Sigma, Deisenhofen
Ziege-Anti-Kaninchen-Peroxidase	Amdex, Amersham, Braunschweig
Ziege-Anti-Maus-IgG2a-PE	Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA
Maus-Anti-human-IgG	Amdex, Amersham, Braunschweig
Strepavidin-*horseradish peroxidase*	Amersham, Braunschweig

3.1.7 Enzyme, Inhibitoren und Kits

Desoxynucleotidmischung	Roche, Mannheim

ECL-Western Blot Detektionskit	Amersham, Braunschweig
ELISA mIL-6	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA mTNF	Becton Dickinson, Heidelberg
Nano Orange protein quantitation kit	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
pCR 2.1-Topo Cloning Kit	Invitrogen, San Diego, USA
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
PCR Reaction Kit Ready Mix Taq	Sigma, Deisenhofen
PCR-Puffer (10X)	Roche, Mannheim
Pfu-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Protease Faktor Xa	Roche Diagnostics, Mannheim
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Gelextrationskit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim
	Biolabs, MA, USA
Syprored protein stain	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
T_4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden

3.1.8 Molekulargewichtsstandards

DNA-Längenstandards:

Die Größen der Nukleinsäurebruchstücke der in dieser Arbeit verwendeten Größenstandards GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus und GeneRuler 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) sind im Folgenden aufgelistet:

100 bp DNA Ladder Plus: **1kb DNA Ladder:**

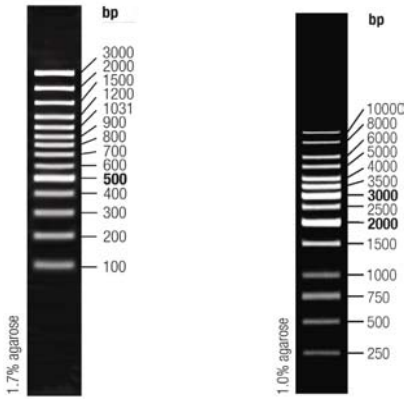


Abb. 3.1: DNA-Längenstandards

Molekulargewichtsstandard für Proteine:

Zur Bestimmung der Molekulargewichte in SDS-Gelen wurde SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard von Invitrogen, San Diego, USA benutzt:

3.1.9 Vektoren und Plasmide

Flag-mTLR4 in pcDNA 3.1	Bruce Beutler, Scripps, La Jolla, USA
mMD-2 in pFlag-CMV-1	Werner Falk, Regensburg
mMD-2 (mut.)-huIgGFc in pcDNA 3.1	Wim Buurman, Maastricht, Niederlande
p3xFlag-CMV-8	Sigma, Deisenhofen
p3xFlag-CMV-9	Sigma, Deisenhofen
pcDNA 3.1	Invitrogen, San Diego, USA
pCoHygro	Invitrogen, Karlsruhe
pCR2.1	Invitrogen, San Diego, USA
pFastBac 1	Invitrogen, Karlsruhe
pFlag-CMV-1	Sigma, Deisenhofen
pMT/BiP/V5-His C	Invitrogen, Karlsruhe
pSignal IG plus	R&D Systems, Wiesbaden

3.1.10 Primersequenzen

Oligonukleotide wurden von den Firmen Qiagen (Köln) und TIB Molbiol (Berlin) synthetisiert.

Sequenzierprimer

M13 (-20) forward	5´-TTGTAAAACGACGGCCAG TG-3´
M13 reverse	5´-GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT-3´
pMT forward	5´-CATCTCAGTGCAACTAAA-3´
pMT reverse	5´-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3´
Fc500PrFwd	5´-GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC-3´
T2earl	5´-CTGGGGGTAACATCGCTTTT-3´
T2earl2	5´-GGAAATCCTTACCAGACACTGGGGGTA-3´
T2earl1	5´-GTGGCCATAACAGTCCTCTTCAGCA-3´
T2late	5´-CTTCGTTGTTCCCTGTGTTGCTGGT-3´
T2mid	5´-ACTTGGCCAGGTTCCAGTTTTCACC-3´
T2mid2	5´-ATTCCCTCCTGGAGAAGGTGAAGCG-3´
T2late	5´-GCCTGGCCTTCTCTACAAAC-3´
T4earl	5´-CCTGGTTGGTTTACACGTCC-3´

T4earl2	5´-TGGAAATTTTTGAACCCTCTATCATGGAA-3´
T4mid	5´-AAATTGGCCTCTCTAGAAAG-3´
T4late1	5´-TGGCTGGCAATTCTTTCAAAGACAACA-3´
T4late2	5´-TTGCAGTTTCAATCGCATAGAGACATCT-3´
T4late3	5´-TGTGAACATCAGAAATTCCTGCAGTGGG-3´

Oligonukleotide und PCR Primer

KpnIFlagTLR2 (1)	5´-GGTACCGACTACAAAGACGATGACGACAAGCAGG AGTCTCTGTCATGTGATGC-3´
TLR2BglII (2)	5´-AGATCTTGGTGACATTCCAAGACGGAGGG-3´
KpnFlagTLR4 (3)	5´-ATGGTACCGACTACAAAGACGATGACGAC-3´
TLR4BamHI (4)	5´-ATGGATCCGTCATATAACAGGTAGAATTATTAAAA TCC-3´
BglIIFlag (5)	5´-ATAGATCTGACTACAAAGACGATGACGAC-3´
Fcblunt (6)	5´-TCATTTACCCGGAGACAGG-3´
NcoIFlag (T4Fc) (7)	5´-ATCCATGGGACTACAAAGACGATGACGAC-3´
NcoIFlag (LPS-Trap) (8)	5´-CATGCCATGGGACTACAAAGACGATGACGAC-3´
TLR4SpeI (9)	5´-ATACTAGTCATATAACAGGTAGAATTATTAAAATCC AA-3´
XhoIMD-2 (10)	5´-ACTTCGAGGAATCTGAGAAGCAACAGTG-3´
MD-2AgeI (11)	5´-ATACCGGTCTAATTGACATCACGG-3´
SpeIflLinker (12)	5´-CTAGTGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTC TGGCGGTGGCGGATCGC-3´
flLinkerXho (13)	5´-TCGAGCGATCCGCCACCGCCAGAGCCACCTCCGC CTGAACCGCCTCCACCA-3´
AgeIFc (14)	5´-ACCGGTATCGAAGGTCGTGGTGGTGGT-3´
FcSal (15)	5´-GTCGACTCATTTACCCGGAGACA-3´

3.1.11 Bakterien und Zelllinien

E.coli Stämme:

DH10bac	Invitrogen, Karlsruhe
TOP10	Invitrogen, Karlsruhe
XL1-blue	Stratagene, Heidelberg

Eukaryotische Zelllinien:

RAW 264.7	murine monozytische Leukämiezelllinie
Schneider S2 Zellen	*Drosophila* Schneiderzellen
HEK 293	Humane immortalisierte embryonale Nierenzellen
HEK 293T	Humane immortalisierte embryonale Nierenzellen, tragen zusätzlich das *SV40 large T-antigen*
COS-7	Nieren-Zelllinie aus Affen
CHO	Fibroblasten-Zelllinie aus Ovarien chinesischer Hamster
SF-21	Insektenzellen von *Spodoptera frugiperda*
SP2/0-Ag14	Maus-Myelomzelllinie

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Bakterien

LB-Medium:	10 g/l	NaCl
	10 g/l	Bactotryptone
	5 g/l	Hefeextrakt
	in aqua bidest, autoklavieren	
LB-Platten:	15 g/l	Agar
	in LB-Medium, aufkochen, Agar lösen, auf 45°C abkühlen lassen, entsprechende Resistenz zugeben und in Platten gießen	
SOC-Medium:	20 mg/ml	Bactotryptone
	5 mg/ml	Yeast Extract
	0,6 mg/ml	NaCl
	0,2 mg/ml	KCl
	in aqua bidest., autoklavieren und nach dem Abkühlen:	
	1 M	$MgCl_2$, steril filtriert
	1 M	$MgSO_4$, steril filtriert
	2 M	Glucose, steril filtriert

Der jeweilige Bakterienstamm wurde in LB-Medium (mit 100 μg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin 50 μg/ml bei entsprechender Resistenz) bei 37°C durch Schütteln kultiviert. Um die Kultur dauerhaft bei –80°C lagern zu können, wurden 500 μl einer 1:1-Mischung aus Glycerin und LB-Medium mit 500 μl Bakteriensuspension gemischt.

3.2.2 Plasmidvektoren

3.2.2.1 Mini-/ Maxi-Präparation

Die Plasmide wurden laut Anleitung des Herstellers (Mini-Prep, Maxi-Prep: Qiagen) präpariert. Grundsätzlich basiert das Prinzip der Plasmid-Präparation auf der alkalischen Lyse von Bakterien und anschließender Reinigung der DNA über hydrophile Säulen oder Membranen.

3.2.2.2 Transformation von E.coli

Für eine Transformation wurden 0,1-1 μg Plasmid (in 5 μl) mit 50 μl kompetenten Bakterien gemischt und 30 min auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden im Wasserbad bei 42°C für 45 sec erhitzt und sofort für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 500 μl SOC Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37°C geschüttelt.
Alle verwendeten Vektoren besitzen ein Gen für eine Antibiotika-Resistenz, welches nur den mit dem Vektor transformierten Bakterien erlaubt, auf Antibiotika-haltigem Nährboden zu wachsen. Für die Selektion wurden jeweils 50 und 100 μl der Suspension auf geeignete LB-Platten mit Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Blau-Weiß-Selektion

Bei den Vektoren pCR 2.1 und pFastBac konnte zusätzlich eine Differenzierung zwischen religierten Vektoren und Vektoren mit Fragment über das β-Galaktosidase-Gen durchgeführt werden. Diese beiden Vektoren enthalten die Sequenz für das α-Peptid der β-Galaktosidase (lac-Z-Gen). Organismen, die defizient für dieses Peptid sind, aber alle anderen Untereinheiten der β-Galaktosidase exprimieren, bilden nach Aufnahme des Plasmids biologisch aktives Enzym. Isopropyl-thio-galaktosid (IPTG) dient als Induktor für die β-Galaktosidase, wird jedoch nicht durch diese zersetzt. Durch Umsetzung eines chromogenen Substrats (z.B. X-Gal) färbt sich eine Kolonie blau. Wurde jedoch ein DNA-Fragment in die *multiple cloning site* (MCS), die innerhalb des lac-Z-Gens liegt, insertiert, wird der Leserahmen des α-Peptids verschoben und die Farbreaktion bleibt aus. Positive Klone erscheinen demzufolge weiß und können von negativen (blau) unterschieden werden. Zur

Blau-Weiß-Selektion wurden die Mediumplatten eine Stunde vor dem Ausplattieren mit 40 µl einer X-Gal-Stammlösung und 4 µl IPTG (1 M in PBS) behandelt. Am folgenden Tag wurden die weißen Kolonien analysiert.

Für die Herstellung von Minipreps wurden mehrere Kolonien gepickt und nach über Nacht Kultur in LB-Medium präpariert. Die Transformation wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft und Glycerinkulturen (siehe 3.2.1) wurden angelegt.

3.2.3 Präparation, PCR, enzymatische Manipulation, Analyse und Sequenzierung von DNA

3.2.3.1 Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge erfolgte in Agarosegelen, wobei die Agarosekonzentration 1% (w/v) betrug. Dazu wurde die Agarose mit TAE (1x) aufgekocht und unter Rühren auf 60°C abgekühlt, Ethidiumbromidlösung (2 µl pro 100 ml TAE) zugefügt und das Gel gegossen. Als Laufpuffer diente TAE (1x). Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer im Verhältnis 1:4 vermischt, in die vorbereiteten Geltaschen pipettiert und durch Anlegen einer elektrischen Spannung (80-100 Volt) aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden für analytische Zwecke auf einem UV-Schirm bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und photographiert.

3.2.3.2 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Mit Hilfe zweier entgegengesetzt orientierter, spezifischer Primer lassen sich bei der PCR aus DNA-Proben Sequenzen amplifizieren (Mullis *et al*, 1986). Durch die Verwendung spezifischer Primer (siehe 3.1.10) wurde diese Methode zur Amplifizierung von DNA, speziell zur Einführung terminaler Sequenzen für Endonukleasen genutzt. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Als Vorlage diente ein Plasmid oder cDNA aus LPS stimulierten RAW 264.7 (für die Klonierung von T2Fc).

Reaktionsansatz:

Template-Lösung (Plasmid ca. 10 ng)	1 µl
PCR Puffer, 10x konz.	5 µl
5´Primer (je 20 µM)	1 µl
3´Primer (je 20 µM)	1 µl

Desoxynukleotidmischung 10 mM	1 µl
Pfu-Polymerase	1 µl
Wasser	40 µl

Nach einem Denaturierungsschritt von 5 min bei 95°C wurden üblicherweise 35 Zyklen des nachfolgenden Reaktions-Schemas angewandt:

Denaturierung	95°C	30 sek
Primerannealing	Temperatur je nach Primerpaar	30 sek
Elongation	72°C	Zeit je nach Anzahl bp der zu amplifizierenden DNA: pro 1 kb 60 sek.
Finale Elongation	72°C	10 min

Anschließend wurden die amplifizierten PCR Fragmente auf einem Agarosegel analysiert und gereinigt (Gelextraktion oder PCR Purification-Kit).

3.2.3.3 Restriktionsverdau

Zum Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen wurden die Puffer- und Enzymkombinationen der Firmen Roche und New England Biolabs verwendet. Grundsätzlich wurden Ansätze im 20 µl-Format folgendermaßen durchgeführt:

x µl DNA (0,1 – 10 µg)
2 µl Puffer – je nach Enzym abgestimmt (Roche-Tabelle)
ad 18 µl H_2O
2 µl Enzym

Dieser Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert.

3.2.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten durch Gelextraktion

Um Strangbrüche der DNA zu vermeiden, wurde bei der präparativen Elektrophorese längerwelliges UV-Licht verwendet (366 nm). Bei der Isolation wurde der gewünschte Bereich mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufbereitung von DNA aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des Qiagen Gelextraktionskits nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

3.2.3.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

Isolierte und durch Restriktionsverdau gewonnene DNA-Fragmente wurden über Restriktionsschnittstellen in entsprechend geschnittene und dephosphorylierte Plasmide ligiert. Die Ligation erfolgte zwischen 15 min und 1 h bei Raumtemperatur. Prinzipiell wurden DNA-Ligationen in einem Ansatz von 15 µl durchgeführt, wobei das DNA-Insert im Verhältnis zum linearisierten Plasmid im Überschuss vorhanden war (ca. 4:1). Über PCR gewonnene DNA-Fragmente wurden in den pCR 2.1-Topo-Vektor nach Anweisung zwischenkloniert.

3.2.3.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Alle Sequenzierungen wurden von Geneart, Biopark Regensburg, angefertigt. Sequenzvergleiche wurden mit Proteinsequenzen in der *Nucleotid Sequence Bank* des *Entrez* Browsers des National Institute of Health (NIH, Bethesda, Maryland, USA) durchgeführt (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html).

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kulturbedingungen

Die Zelllinien RAW 264.7, SP2/0 und CHO wurden in RPMI Medium 1640 mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) bei 37°C, 5% Kohlendioxidgehalt und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator kultiviert. HEK 293, HEK 293T und RAW 264.7 (für den Transwellassay) wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS bei 37°C und 10% Kohlendioxidgehalt kultiviert.
Die Kultivierung von COS-7 Zellen erfolgte in DMEM-Medium, in Gegenwart von 1,0 g/l D-Glukose, 3,7 g/l $NaHCO_3$, 1,0289 g/l N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin und 5% FCS bei 37°C und 10% Kohlendioxidgehalt. Schneider S2 (S2) Zellen wurden in Insect Xpress Medium mit 10% FCS bei 21°C ohne CO_2 kultiviert. Zur Selektionierung stabiler S2 Transfektanden wurde dem Medium 300 µg/ml Hygromycin zugesetzt.
Zur Expression von Fusionsproteinen mit anschließender Reinigung über Affinitätschromatographie oder Größenausschlusschromatographie wurde den Medien kein FCS zugesetzt.

3.3.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzahl und die Vitalität der Zellen wurden mikroskopisch mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlusstests bestimmt. Dazu wurde aus der Zellsuspension ein Aliquot entnommen und mit gleichem Volumen Trypanblaulösung verdünnt. Anschließend wurden in einer Neubauer-

Zählkammer die lebenden (nicht gefärbten) und toten (blau gefärbten) Zellen innerhalb eines Großquadrates (= 16 Kleinquadrate) unter dem Phasenkontrast-Mikroskop ausgezählt.
Berechnung der Zellzahl: z [Zellen/ml] = Z x V x 10^4
Z = Zahl der ungefärbten Zellen in einem Großquadrat (1 mm^2);
V = Verdünnungsfaktor

3.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz geerntet und in 1 ml eiskaltem Einfriermedium suspendiert. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen überführt und in Styroporbehältern für 24 h bei -70°C gelagert. Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgte in Flüssigstickstoff. Zum Auftauen wurden die Zellen direkt aus dem Stickstoff in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und sofort nach dem Auftauen in warmes, serumhaltiges Medium aufgenommen. Nach Absinken der Zellen wurde das Medium gewechselt.

Einfriermedium für alle Säugerzelllinien: 50% RPMI 1640, 40% FCS, 10% DMSO (Dimethylsulfoxid)
Einfriermedium für S2 Zellen: 70% Insect Express, 20% FCS, 10% DMSO

3.3.4 Stimulationsexperimente mit TLR Liganden in RAW 264.7

RAW 264.7 wurden mit einer Dichte von 10^6 Zellen/ml in 96-Loch Platten ausgesät und mit den angegebenen Fusionsproteinen kultiviert. Nach 30 min wurden die Zellen mit verschiedenen TLR Aktivatoren (Pam3Cys, LTA oder LPS aus *Salmonella abortus equi* S-Form in verschiedenen Konzentrationen) 12 h in einem Volumen von 100 µl stimuliert. Anschließend wurde das proinflammatorische Zytokin IL-6 im Überstand per ELISA gemessen.

3.3.4.1 Transwellassay

Um die Aktivität der LPS-Trap zu überprüfen, wurden LPS-Trap transfizierte HEK 293T Zellen in eine 24-Loch Platte mit einer Dichte von 5x10^5 Zellen/ml ausgesät. Nach 12 h wurde ein mit RAW 264.7 beladenes Transwell (8x10^4 Zellen/ml) eingesetzt und 8 h mit den transfizierten HEK 293 kokultiviert. Die Zellen wurden dann mit den angegebenen LPS-Konzentrationen über Nacht stimuliert (Gesamtvolumen 800 µl). Anschließend wurde TNF im Überstand per ELISA gemessen.

3.3.5 Transfektionen

3.3.5.1 Calciumphosphattransfektion

Um HEK 293, CHO, oder COS-7 Zellen transient mit Plasmid-DNA zu transfizieren, wurde die Methode der Calciumphosphatpräzipitation verwendet. Das Prinzip basiert darauf, dass eine Mischung aus DNA, Calcium und Phosphatpuffer einen feinkörnigen Niederschlag aus Calciumphosphat und DNA bildet. Dieses Präzipitat wird auf die Zellen pipettiert, welche diese Kristalle dann per Endozytose aufnehmen.

$3x10^6$ Zellen wurden in einer 100-mm^2 -Schale in 5 ml Medium ausgesät und 24 h kultiviert. Zu Beginn der Transfektion wurde das Medium gewechselt und mit der Herstellung des Präzipitates begonnen. Zu diesem Zweck wurden 500 µl $CaCl_2$-DNA-Lösung (10 µg DNA in 500 µl 0,5 M $CaCl_2$) mit 500 µl 2 x HBS gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich ein feines Präzipitat bildete. Das Calciumphosphat-DNA-Gemisch wurde dann tropfenweise gut verteilt auf die Schalen mit den Zellen pipettiert und für 6 h in einen Brutschrank gestellt. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und frisches Medium zugegeben.

Falls die Expressionsversuche zur Gewinnung von rekombinanten Proteinen mit anschließender Affinitätschromatographie oder zur Konzentrierung von Überständen per Größenausschlusschromatographie dienten, wurden die Zellen nach dem Mediumwechsel ohne FCS kultiviert. Nach 48 h wurden die Überstände analysiert, um eine transiente Proteinexpression nachzuweisen.

3.3.5.2 Transfektionen mit kationischen Liposomen

Das Prinzip der sog. Lipofektion beruht auf einer Ultraschallbehandlung eines Lipides oder Lipidgemisches in wässriger Lösung, bei der sich Liposomen bilden. Dieses Reagenz (Fugene 6) wird mit Zellkulturmedium und mit der DNA vermischt. Üblicherweise wurde ein Ansatz von 3:1 (Fugene Reagenz: DNA) in 500 µl gewählt, gut gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Fugene-DNA Komplexe zu $3x10^6$ S2 Zellen/ml in einer 25 cm^2 Zellkulturflasche gegeben. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit 500 µM $CuSO_4$ stimuliert und 3 Tage kultiviert bevor die Proteinexpression analysiert wurde. In dieser Zeit fusionieren die Liposomen-DNA-Komplexe mit der Zellmembran und die DNA gelangt in den Zellkern (Mechanismus unbekannt).

3.3.5.2.1 Stabile Transfektion in S2 Zellen

Zur Herstellung stabiler S2 Transfektanden wurden S2 Zellen mit dem Expressionsplasmid und einem Vektor, der eine Hygromycin Resistenz enthielt, (pCoHygro) im Verhältnis 20:1 kotransfiziert. Für die Transfektion unter 4.1.3.5.3 wurde mit einem Verhältnis von 50:1 (LPS-Trap in pMT: pCoHygro) kotransfiziert. Das weitere Verfahren ist gleich der oben beschriebenen Methode zur transienten Transfektion von S2 Zellen. Die Zellen wurden anschließend über 4 Wochen in Medium mit 300 μg/ml Hygromycin kultiviert. Nach der Selektionsphase wurden die Zellen bis zu einer Mindestdichte von $6x10^6$ Zellen pro ml expandiert, mit $CuSO_4$ stimuliert (500 μm) und die Proteinexpression nach 5 Tagen analysiert.

3.3.5.2.2 Transfektion mit jetPEI

Die Methode der Lipofektion mit jetPEI wurde für die Zelllinien SF-21 und HEK 293T (die im Transwell-Experiment eingesetzt wurden) benutzt.

Das Vorgehen ist ähnlich dem der Transfektion mit Fugene 6. Die Zellen wurden zu $3x10^6$ pro 100-mm^2 Zellkulturschale ausgesät und mit 10 μg DNA nach den Anweisungen des Herstellers transfiziert.

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Im ELISA wurde TNF und IL-6 aus Überständen von RAW 264.7, außerdem anti-lösliche (soluble, s)TLR4 sezernierende Hybridome und anti-sTLR2 bzw. anti-sTLR4 Kaninchen-Antiseren, quantitativ erfasst.

Das Prinzip eines ELISAs ist die Verwendung eines Enzyms zur Detektion einer Antigen-Antikörper Bindung. Entweder wird das Antigen direkt an eine Mikrotiterplatte gebunden und über einen Antikörper nachgewiesen oder man verfährt nach dem sogenannten „Sandwich"-Prinzip. Die Mikrotiterplatte wird dazu mit einem „Fang-Antikörper" beschichtet. Nach Inkubation mit der antigenhaltigen Probelösung wird das an den „Fang-Antikörper" gebundene Antigen mit einem zweiten Antikörper, dem sog. Sekundärantikörper, nachgewiesen, wobei dieser mit einem Enzym gekoppelt sein kann. Bei unmarkierten Sekundärantikörpern verwendet man einen dritten Antikörper, der gegen den Sekundärantikörper gerichtet ist und eine Enzymmarkierung trägt. In den verwendeten ELISAs wurde stets das Enzym Peroxidase benutzt. Das Enzym setzt ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt um, das mit einem Photometer detektiert werden kann.

3.4.1.1 TNF und IL-6 Elisa

Die Tests wurden in 96-Loch Platten nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Platten wurden über Nacht mit einem „Fang-Antikörper“ beschichtet. Nach dreimaligem Waschen wurde in jede Vertiefung einer 96-Loch Platte 50 µl der Probe in Duplikaten vorgelegt. Die Platte wurde bei RT für 2 h inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. In jede Vertiefung wurde dann 200 µl einer Mischung aus biotinyliertem Antikörper Reagenz und Strepavidin-*horseradish peroxidase* (HRP)-Lösung gegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 2 h bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden 100 µl der TMB-Substrat-Lösung zugegeben und anschließend wiederum 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl ELISA-Stopplösung abgebrochen. Entstandene Farbkomplexe wurden mit einem Absorptionsspektrometer (ELISA-Reader) bei 450 nm vermessen. Sämtliche Auswertungen der Messungen wurden mit der Software *Softmax for Windows* (Version 2.35) durchgeführt.

3.4.1.1.1 ELISA zum Nachweis geeigneter Hybridomüberstände

Um Mediumüberstände von Hybridomen, die Antikörper gegen sTLR4 sezernierten, auf ihre Spezifität zu untersuchen, wurde ebenfalls ein ELISA-Testsystem benutzt. Die Antikörper Überstände wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, murinen TLR4 (spezifisch) und murinen TLR2 (unspezifisch) binden zu können. Zur Durchführung dieses ELISAs wurden 96-Loch Platten mit den rekombinanten Fusionsproteinen T2Fc und T4Fc in Beschichtungspuffer (1 µg/ml Fusionsprotein in Beschichtungspuffer) über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde jedes Loch mit 200 µl Blockierlösung versetzt und wiederum dreimal gewaschen. Anschließend wurde pro Loch 200 µl Hybridomüberstand für 1 h auf die zu testenden rekombinanten Proteine gegeben. Als Detektionsantikörper wurde ein Peroxidase gekoppelter Kaninchen-anti-Maus-Antikörper verwendet. Die Detektion erfolgte identisch mit der oben aufgeführten Arbeitsvorschrift.

3.4.1.2 ELISA zum Nachweis von polyklonalen anti-sTLR2 und anti-sTLR4 Antiseren

Die Durchführung dieses ELISAs erfolgte ähnlich wie das oben aufgeführte ELISA Verfahren zum Nachweis von Hybridomüberständen. Zur Detektion wurde ein Peroxidase gekoppelter Ratte-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet.

3.4.2 Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden auf einem FACSCalibur durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Cell Quest 3.1 f für Macintosh OS. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienten

Allophycocyanin (APC) und Phycoerythrin (PE). Die Messungen wurden mit 3 bzw. 4 Parametern durchgeführt, die folgendermaßen belegt waren:

1. Forward scatter (FSC) Zellform/Zellgröße
2. Sideward scatter (SSC) Granularität
3. Fluoreszenzkanal 2 (Fl1-H) APC-Fluoreszenzintensität
4. Fluoreszenzkanal 4 (Fl2-H) PE-Fluoreszenzintensität

Alle Parameter wurden bei der Auswertung logarithmisch aufgetragen.

Die Durchflusszytometrie wurde zur Analyse der Oberflächenverteilung von CD14, TLR2 und TLR4 auf Monozyten bzw. Granulozyten von Patienten mit Sepsis oder gesunden Kontrollen benutzt. Zur Bestimmung wurde wie folgt verfahren:

***Ex vivo* Vollblut Assay**

Innerhalb 48 h nach der Diagnose einer Sepsis wurde Patienten Blut in sterile Lithium Heparin Röhrchen abgenommen und sofort mit dem *ex vivo* Vollblut Assay begonnen. Gesunden Kontrollen wurden ebenso Blut abgenommen und dieses auch sofort weiterverarbeitet. 1 ml Blut wurden für 15 min bei 37°C mit 40 ng/ml LPS (aus *Salmonella minnesota)* bzw. 0,9% NaCl inkubiert und anschließend in PBS gewaschen.

Markierung von Monozyten und TLR

Monozyten wurden mit APC-gekoppelten anti–CD14-Antikörpern markiert. Die Oberflächenverteilung von TLR2 wurde mit einem monoklonalen anti-humanen Antikörper (Klon TL2.1) ermittelt, der mit einem sekundären PE-gekoppelten Antikörper (Anti-Maus IgG2a) gefärbt wurde. Die Oberflächenverteilung von TLR4 wurde mit einem PE-gekoppelten anti-humanen TLR4 Antikörper (Klon HTA 125) ermittelt. Zellen und Antikörper wurden für 15 min auf Eis inkubiert und die nicht gebundenen Antikörper mit PBS abgewaschen. Anschließend wurde eine Erythrozytolyse durchgeführt (FACS Lysing Solution).

Messung der Oberflächenverteilung mittels Durchflusszytometrie

Die Oberflächenverteilung von TLR2, TLR4 und CD14 wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Zuerst wurde das Durchflusszytometer mit fluoreszierenden „microbeads“ (Quantum 27 R-PE) nach Anweisung des Herstellers kalibriert, um eine Quantifizierung der Proben auf einer Standardkurve zu ermöglichen. Nach der Kalibrierung wurden keine weiteren Anpassungen mehr vorgenommen.

Die Fluoreszenzen FL2 (rot) der PE-gekoppelten TLR-Antikörper und FL4 (orange) der APC-gekoppelten anti–CD14-Antikörper wurden simultan im FSC/SSC analysiert (duales Lasersystem mit 488 nm bzw. 635 nm Anregungswellenlänge).
Die Messung der PE Fluoreszenz (FL 2) erfolgte über einen 585 nm Bandpassfilter, der mit 23.3 % des Signals über FL 1 kompensiert wurde. Die APC Fluoreszenz (FL4) wurde mit einem 661 nm Bandpassfilter bestimmt und mit 9,8% des Signals über FL3 kompensiert. Die TLR Oberflächenexpression wurde als positiv beurteilt, wenn FL2 oberhalb von FL2 der negativen Kontrolle (Autofluoreszenz nicht markierter Zellen) lag. Dementsprechend wurden TLR negative bzw. -positive Zellen durch zwei Marker M1 und M2 diskriminiert. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Cell Quest 3.1 f. Die quantitative TLR-Bestimmung erfolgte über die Formel FL2 x M2 (%). Die TLR-Expression nach LPS-Stimulation wurde als Stimulationsindex errechnet: FL2 nach Stimulation mit LPS / FL2 ohne LPS Stimulation.

3.4.3 Herstellen monoklonaler Antikörper

Zur Produktion monoklonaler Antikörper werden gesunde B-Lymphoblasten und neoplastische Myelomazellen zu sog. Hybridomazellen fusioniert. Die Hybridomazelle besitzt die Fähigkeit einer Plasmazelle zur Produktion eines spezifischen Antikörpers und die einer Tumorzelle, welche sich unbegrenzt teilen kann. Ausgehend von einer einzelnen Hybridomazelle entstehen durch Teilung identische Zellklone, die spezifische identische Antikörper bilden, welche als monoklonale Antikörper bezeichnet werden.

3.4.3.1 Immunisieren einer Maus

Eine TLR4-defiziente Maus (freundlicherweise von Marina Freudenberg, Freiburg, erhalten) wurde intraperitoneal (i.p.) mit der gereinigten extrazellulären Domäne von murinem TLR4 (50 μg in 250 μl Titermax Adjuvans) dreimal in einem Abstand von etwa 3 Wochen immunisiert. Zur Kontrolle, ob es zu einer Immunantwort kommt, muss Blut direkt vor der Immunisierung und 5 Tage nach der Injektion per ELISA untersucht werden. 4 Tage nach der letzten Injektion wurde die Maus mit einem Genickbruch getötet und die Milz steril entnommen, wobei die halbe Milz der Maus für die Fusion weiterverwendet und die zweite Hälfte als Sicherheit in Stickstoff eingelagert wurde.

3.4.3.2 Fusion

Die Milz der immunisierten Maus wurde durch ein Metallsieb gedrückt, um eine Zellsuspension zu erhalten. Die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem RPMI-Medium gewaschen, um Bindegewebs- und Fettreste zu entfernen, gezählt (aus der halben Milz konnten $5x10^8$ Zellen gewonnen werden) und für die Zellfusion verwendet.

Zur Fusion wurde die Maus-Myelomzelllinie SP2/0-Ag14 (SP2/0 Zellen) verwendet (Shulman *et al*, 1978). Die Myelomzellen wurden mit serumfreiem RPMI-Medium zweimal gewaschen, gezählt und in einem Verhältnis von 3:1 ($5x10^8$ Milzellen mit $1,6x10^8$ SP2/0 Zellen) in einem 50 ml Falcontube gemischt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet vorsichtig aufgeklopft. Anschließend wurde 1 ml vortemperiertes PEG1500 zugegeben und die Mischung für 1 min ins Wasserbad (37°C) gestellt. Innerhalb der nächsten 5 min wurde langsam HAT-Medium zugegeben bis 50 ml erreicht waren. Dann wurde auf ein Gesamtvolumen von 100 ml mit Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT)-Medium aufgefüllt und auf 10 96-Loch-Platten, die tags zuvor mit 10^4/Loch Peritonealmakrophagen (freundlicherweise vom Institut für Immunologie, Uniklinikum Regensburg, bereitgestellt) pro Loch beschichtet worden waren, verteilt (pro Well 100 µl). Durch den Zusatz der sog. Feederzellen wird erstens konditioniertes Medium erzeugt und zweitens werden tote Zellen und Zellreste durch Phagozytose beseitigt. Die Selektion fusionierter Zellen erfolgte im HAT-Medium, welches Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält. Aminopterin, ein Analog der Dihydrofolatsäure, blockiert kompetitiv die Dihydrofolat-Reduktase und damit die Biosynthese von wichtigen DNA-Bausteinen. Da diese Bausteine wichtig für die DNA Synthese sind, können Myelomzellen, die einen Defekt in dem Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) aufweisen, in Gegenwart von Aminopterin nicht überleben. Milzzellen sind zwar in der Lage, den Block durch Nutzung von Hypoxanthin und Thymidin zu umgehen, sterben aber aufgrund ihrer begrenzten Lebenszeit. Nur Hybridome überleben die Kultur in HAT-Medium, weil sie gleichzeitig über die Unsterblichkeit der Myelomzellen und den metabolischen Seitenweg der Milzzellen verfügen. Mittels ELISA können diejenigen Zellklone detektiert werden, welche die gewünschten Antikörper produzieren.

Diese Klone werden dann subkloniert um sicher zu stellen, dass es sich wirklich um einen einzigen Zellklon handelt. Durch *limiting-dilution* wird eine „Vereinzelung“ der positiven Klone erreicht, so dass theoretisch nur noch 0,5 Zellen pro Kultur vorhanden waren. Die daraus gewachsenen Klone wurden wiederum getestet und zunächst an HT-Medium, schließlich an RPMI-Medium adaptiert.

3.4.4 Herstellung polyklonaler Antikörper

Zur Gewinnung polyklonaler Antiseren aus Kaninchen wurden vier Tiere dreimal im Abstand von 2 Wochen mit dem Antigen immunisiert. Zwei Kaninchen erhielten jeweils das lösliche TLR2 Protein, zwei erhielten lösliches TLR4. Pro Immunisierung wurden 50 μg des Antigens mit PBS auf ein Volumen von 1 ml verdünnt und mit 1 ml Titermax Adjuvans vermischt. Anschließend erfolgten 4 Injektionen von je 500 μl subkutan in die Flanken (2x) und intramuskulär in die Hinterläufe (2x) des Tieres. Fünf Tage nach der Verabreichung des Antigens wurde den Tieren am Ohr Blut entnommen und der Antikörpertiter im Serum mittels ELISA bestimmt.

3.5 Proteinchemische Methoden

3.5.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE

Bei der SDS-Elektrophorese wandern negativ geladene SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zum Pluspol. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer Polyacrylamidmatrix die SDS-Proteinkomplexe nach ihrer Größe auf. Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden 4-12% SDS-Gele der Firma Invitrogen verwendet. Die aufzutragenden Proben wurden mit 6x-Lämmli-Probenpuffer gemischt und 7 min bei 70°C aufgekocht. Nach anschließendem Abkühlen wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 200 V für etwa 1 h (EI9001-XCELL II Mini Cell).

3.5.2 Western Blotting

3.5.2.1 Semi-dry-Technik

Zur Immobilisierung von Proteinen aus SDS-Gelen wurden diese im Semi-dry-Verfahren durch elektrophoretischen Transfer auf Membranen übertragen (Towbin *et al*, 1979). Jeweils drei Filterpapiere (Whatman) wurden in die drei Blotpuffer eingelegt, die Nitrozellulose-Membran (Optitran BA-S 83) auf Gelgröße ausgeschnitten und mit Kathodenpuffer C benetzt. Das SDS-Gel wurde aus der Elektrophoresekammer entnommen und in Kathodenpuffer C geschwenkt. Der Zusammenbau des Blotsandwiches ist in Abbildung (Abb. 3.2) dargestellt. Beim Aufbau muss darauf geachtet werden, dass er luftblasenfrei ist, damit ein vollständiger, flächendeckender Proteintransfer erfolgen kann. Die Übertragung der Proteine erfolgte in einem Halbtrocken-Transferapparat (Biometra Fastblot B44) bei 1,5 mA/cm^2 Gelfläche für die

Dauer von 2 h. Die Membran konnte nun trocken gelagert oder gleich für einen Protein-Nachweis verwendet werden.

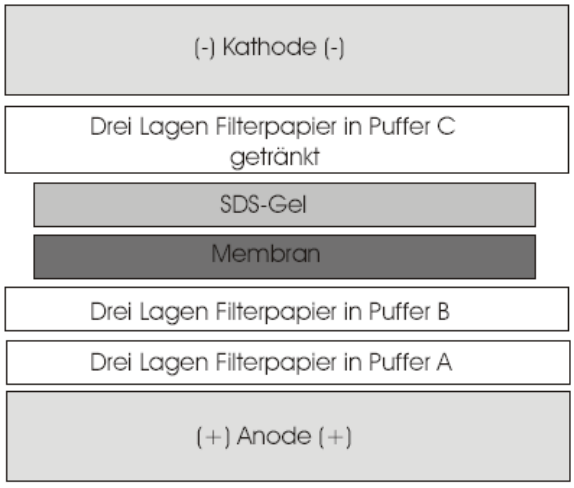


Abb. 3.2: Schematischer Aufbau der Blot-Apparatur

3.5.2.2 Tank-Blot Technik

Zur Auftrennung von großen Proteinen (über 200 kDa) wurden 3-8% Gradientengele der Firma Invitrogen und das Novex-System zum Proteintransfer benutzt. Elektrophorese und Proteinblot wurden nach Anleitung des Herstellers in einer Novex-Kammer durchgeführt. Die Übertragung der Proteine erfolgte mittels sog. Tank-Blottings bei konstanter Stromstärke (200 mA). Dabei werden 2 poröse Kissen in eine Kassette eingespannt und in einen Tank mit Puffer eingesetzt.

3.5.3 Nachweis von Proteinen

3.5.3.1 Färbung von Proteinen in Gelen

Zur Proteinfärbung in Gelen wurde der Farbstoff Syprored verwendet. Das SDS-Gel wird in ein Essigsäure/Wasser-Gemisch mit Zusatz von Syprored Reagenz (7% Essigsäure + 1 µl Syprored Reagenz) 30 min eingelegt. Die Proteine im Gel werden in einem Schritt fixiert, also denaturiert und ausgefällt, und mit dem Syprored Farbstoff angefärbt. Syprored selbst fluoresziert kaum, wenn es aber an SDS-Protein Komplexe bindet, kann es mit Licht von 470 nm Wellenlänge sichtbar gemacht werden. Das Emissionsmaximum liegt bei 618 nm. Die Auswertung erfolgt im Typhoon Laserscanner.

3.5.3.2 Immunofärbung von Proteinblots

Die Membranen wurden nach dem elektrophoretischen Transfer für 2 h mit Blockierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abnehmen der Lösung wurde der in der Blockierlösung verdünnte primäre Antikörper in der jeweiligen Verdünnung (alle Antikörper 1:1000) auf die Membran gegeben und 1,5 h bei RT geschwenkt. Danach wurde dreimal für 5 min mit Waschlösung gewaschen und eine weitere Stunde mit Enzym-gekoppeltem, sekundärem Antikörper (Verdünnung 1:4000), der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten wurde der Blot je nach verwendetem Enzym gefärbt. Bei der Peroxidase wurde das ECL-Färbeprotokoll (Amersham $ECL_{detection}$) verwendet. Dabei katalysiert die am sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase die Oxidation von Luminol und die entstehende Chemilumineszenz wird auf einem sensitiven *Hyperfilm* detektiert. War der sekundäre Antikörper an alkalische Phosphatase gekoppelt, wurde der Blot mit Nitro blue tetrazolium chlorid/ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphat (NBT/BCIP) nach dem Protokoll des Herstellers gefärbt.

3.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um Proteinmengen quantitativ zu erfassen, wurde der Nano Orange Protein Quantitation Kit nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Nach Zugabe der verdünnten Nano Orange-Lösung zur Proteinprobe wird das Gemisch auf 95°C für 10 min erhitzt. Die wässrige Nano Orange Lösung fluoresziert kaum, bei Interaktion mit Proteinen wird die Fluoreszenzaktivität jedoch drastisch verstärkt. Nach Abkühlung kann die Probenlösung im Fluoreszenzmessgerät bei einem Absorptionsmaximum von 470 nm und einem Emissionsmaximum von 570 nm gemessen werden. Zur Quantifizierung wurde BSA als Standard benutzt.

3.5.5 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation isoliert ein bestimmtes Antigen aus einer Vielzahl von Antigenen einer Lösung. Überstände von transfizierten HEK 293 Zellen (jeweils 3 ml) oder S2 Zellen (jeweils 1 ml) wurden mit 30 µl Protein G Sepharose bzw. Anti-Flag Affinitätsgel (EZview Red ANTI-FLAG M2 Affinity Gel) versetzt und für 1 h in einem Rotor inkubiert. Anschließend wurde das Agarose- bzw. Sepharose-Pellet dreimal mit PBS gewaschen, in ca. 20 µl 6x Lämmli-Probenpuffer aufgenommen und im Western Blot analysiert. Für die Immunpräzipitation mit MTS 510 wurde Protein G Sepharose mit 1 µg MTS 510 in 1 ml PBS für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die gereinigte LPS-Trap (1 µg)

zugesetzt und für 1 h inkubiert (Rotor). Um den T4Fc/MD-2 Komplex in Überständen von RAW 264.7. nachzuweisen, wurden die Mausmakrophagen mit T4Fc (6 mg/ml) versetzt und anschließend der Überstand mit dem MTS 510 gesättigten Protein G Sepharose Pellet immunpräzipitiert.

3.5.6 LPS-Bindungsassay

Zur Untersuchung der Bindung von LPS an die Fusionsproteine (T4Fc, MD-2, T4Fc/MD-2) wurden 3 ml Überstände transfizierter HEK 293T Zellen bzw. S2 Zellen mit biotinyliertem LPS (1 μg) für 1 h inkubiert und anschließend für 1 h mit 30 μl Streptavidin Sepharose immunpräzipitiert. Die gebundenen Proteine wurden im Western Blot detektiert.
Zum Nachweis der LPS Bindung an gereinigte Fusionsproteine (jeweils ca. 1 μg) wurde bei dem ersten Inkubationsschritt mit biotinyliertem LPS zusätzlich rekombinantes Maus-sCD14 (1 μg), und zur Überprüfung der Bindung von gereinigter LPS-Trap außerdem noch rekombinantes Maus-LBP (1 μg) zugegeben.

3.5.7 Affinitätschromatographie

3.5.7.1 Protein A Affinitätchromatographie

Alle Fusionsproteine mit einem huIgGFc-Teil wurden über Protein A Affinitätschromatographie gereinigt. Dazu wurde eine Säule (Econo-Säule) mit 1 ml Protein A Agarose (Affi-Gel Protein A) beladen und mit 25 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde jeweils 200 ml Kulturüberstand, der zuvor über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert wurde, mit Hilfe einer Pumpe (Econo-Pumpe) mehrmals über die Säule geschleust. Nach dem Waschen (50 ml PBS) erfolgte die Elution mit jeweils 2 ml 0.1 M Glycin/HCl Puffer, pH 4. Die einzelnen Elutionsfraktionen wurden sofort gegen PBS dialysiert und bei 4°C gelagert.

3.5.7.2 Affinitätschromatographie über Metallchelatbindende Säulen

Rekombinante Proteine mit einem His-Epitop (6 Histidinreste) wurden über Metallchelat-Affinitätschromatographie gereinigt (Staropoli *et al*, 1997). Da S2 Zellen zur Expression rekombinanter Proteine in Anwesenheit von 500 μM $CuSO_4$ kultiviert wurden, wurde eine modifizierte Metallchelat-Affinitätschromatographie (Lehr *et al*, 2000) verwendet. Eine Säule wurde mit 500 μl chelatbindender Sepharose beladen (Chelating Sepharose), gewaschen und mit Hilfe einer Pumpe mehrmals mit Kulturüberständen (zuvor nicht dialysiert, da $CuSO_4$ zur Bindung an chelatbindende Sepharose essentiell ist) beladen. Das weitere Vorgehen

entsprach der Reinigung über Protein A Agarose. Die Elution erfolgte jedoch mit jeweils 500 µl 10 mM Imidazol in 50 mM Tris pH 8. Die Elutionsfraktionen wurden ebenfalls sofort gegen PBS dialysiert und bei –20°C aufbewahrt.

Zur Reinigung von Fusionsproteinen mit His-Markerpeptid aus HEK 293 Zellen (kein $CuSO_4$ in der Zellkultur vorhanden) wurde die Metallchelat-Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose verwendet. Statt chelatbindender Sepharose wurde Ni-NTA-Agarose als Säulenmaterial verwendet, ansonsten war das Vorgehen identisch der Affinitätschromatographie über chelatbindende Sepharose.

3.5.8 Größenausschlusschromatographie

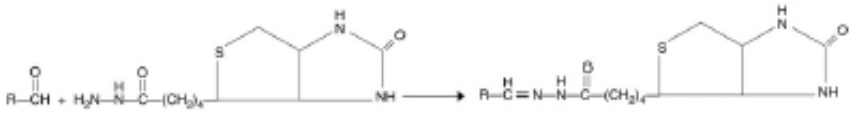
Die Größenausschlusschromatographie wurde mit Hilfe der Centricon Säule (Ausschlussgröße 10 kDa) durchgeführt. 20 ml Überstand von transfizierten HEK 293 Zellen wurde in der Säule mit einem 10 kDa Größenausschlussfilter bis zu einem Endvolumen von 2 ml zentrifugiert. Es fand demnach eine Konzentrierung um den Faktor 10 statt. Die Kontrollüberstände wurden gleichermaßen präpariert.

3.5.9 Chemische oder enzymatische Veränderung an Proteinen oder Naturstoffen

3.5.9.1 Biotinylierung von LPS

500 µl der zu biotinylierenden Substanz (LPS aus *Salmonella abortus equi* S-Form) wurde zuerst mit 500 µl Natrium-*meta*-perjodatlösung (20 mM) versetzt, um reaktive Aldehyde zu generieren. Diese Reaktion fand 30 min auf Eis (lichtgeschützt) statt und wurde mit Glycerin (Endkonzentration 15 mM) gestoppt. Nachdem die Lösung 12 h gegen den Biotin-Kopplungspuffer dialysiert war, wurde die Biotin-Hydrazid-Lösung zugegeben und 2 h rotiert. Biotin-Hydrazid bindet in dieser Reaktion mit seiner Hydrazid-Gruppe an Aldehyde unter Bildung eines Hydrazons. Schließlich werden die nicht reagierenden Substanzen mittels Dialyse abgetrennt.
Die erfolgreiche Biotinylierung wurde im Western Blot überprüft. Biotinyliertes LPS bzw. nicht biotinyliertes LPS (als Negativkontrolle), wurden im SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit HRP-konjugiertem Streptavidin nachgewiesen.

Beispiel für eine ablaufende Reaktion:



3.5.9.2 Protease Xa Verdau

Für den Verdau mit Protease Faktor Xa wurden die gereinigten Fusionsproteine T2Fc und T4Fc gegen einen speziellen Puffer (Protease Xa Verdaupuffer) dialysiert und anschließend 24 h mit Protease Faktor Xa bei RT inkubiert. Von der Protease wurden 1/20 der Menge des Fc-Proteins eingesetzt. Ungeschnittene Fusionsproteine und Fc-Fragmente konnten über Protein A Agarose entfernt werden.

3.6 *In vivo* Experimente mit NMRI Mäusen

Um die *in vivo* Aktivität der LPS-Trap zu testen, wurde 4 weiblichen NMRI Mäusen 1 ml LPS-Trap (50 μg/ml) und 200 μl LPS (LPS von *Salmonella abortus equi*, 5 μg/ml) i.p. gespritzt. Die Mäuse wurden nach 90 min geblutet. Zur Kontrolle wurden 4 weibliche NMRI Mäuse mit 1,2 ml LPS in PBS (0,833 μg/ml = 1 μg/Tier) behandelt. 2 weitere weibliche NMRI Mäuse dienten als Negativkontrolle. Ihnen wurde 1 ml PBS i.p. injiziert. Aus dem Blut der Mäuse wurde Serum gewonnen und anschließend das Zytokin TNF mittels ELISA bestimmt (siehe 3.4.1).

3.6.1 Gewinnung von Serum aus Vollblut

Zur Gewinnung von Serum aus Vollblut wurde das abgenommene Blut zum Gerinnen erst eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend nach einem Kreuzschnitt durch den Pfropf über Nacht bei 4°C stehengelassen. 12 h später wurde das geronnene Blut bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -20°C gefroren.

3.7 Statistik

Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen angegeben. Zur statistischen Analyse wurde das SPSS 11.0 Programm (SPSS Inc, Chicago, Ill.) benutzt. Für den “Transwell-assay” wurden 6 unabhängige Proben mit dem *Wilcoxon signed rank test*

analysiert. Die IL-6 Konzentrationen des T4Fc/MD-2 Hemmexperimentes wurden mit *ANOVA* getestet (3 unabhängige Experimente). Die Analyse des *in vivo* Experiments erfolgte mit dem T-Test für unabhängige Stichproben.

Die Oberflächendichte von TLR2 und TLR4 auf Granulozyten und Monozyten und der Stimulationsindex (Quotienten aus TLR Oberflächendichte nach LPS Stimulation und TLR Oberflächendichte ohne Stimulation) wurden ebenfalls mit *ANOVA* zwischen den einzelnen Sepsis-Subgruppen analysiert. Unterschiede in der Oberflächendichte von TLR2 und TLR4 auf Granulozyten und Monozyten zwischen Kontrollen und Subgruppen septischer Patienten wurden mit Post hoc Unterschieden und *Tanhames T2-Test* untersucht. In allen Experimenten wurde $p<0.05$ als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Pharmakologische Beeinflussung der Signaltransduktion über Toll-like Rezeptor (TLR)2 und TLR4

Für die Auslösung einer Immunantwort gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien sind TLR2 und TLR4 verantwortlich. In der bakteriellen Sepsis gerät diese eigentliche Schutzfunktion aus unbekannten Gründen außer Kontrolle und die resultierende Überaktivierung führt zu schweren Schäden an Organen. In den folgenden Untersuchungen sollte die Hypothese geprüft werden, ob eine Kontrolle der Signaltransduktion von TLR2 und TLR4 durch Ligand-bindende lösliche Rezeptoren diese Überaktivierung verhindern kann.

4.1.1 Untersuchung der Effekte von löslichem TLR2 und löslichem TLR4 auf die Signaltransduktion über TLR

Um die Rolle von löslichem TLR2 und löslichem TLR4 auf die Signaltransduktion über TLR2 bzw. TLR4 zu untersuchen, wurden lösliche chimere Fusionsproteine hergestellt. Da zur Signaltransduktion durch TLRs mindestens eine Dimerisierung nötig ist (Ozinsky *et al*, 2000), wurden zunächst die rekombinanten Fusionsproteine FlagmrsTLR2-huIgGFc (T2Fc) und FlagmrsTLR4-huIgGFc (T4Fc) der Maus produziert.

4.1.1.1 Klonierung von T2Fc und T4Fc

Der gesamte extrazelluläre Teil von murinem (m)TLR2 und mTLR4 wurde mit geeigneten Primern per PCR kloniert (TLR2: Primer 1 und 2, TLR4: Primer 3 und 4). Als Vorlage für TLR2 diente cDNA von LPS stimulierten Mausmakrophagen RAW 264.7 und für TLR4 ein Flag-mTLR4 kodierendes Plasmid. Die Primer führten jeweils 2 Restriktionsschnittstellen in das cDNA-Fragment ein (TLR2: 5' *Kpn I* und 3' *Bgl II*, TLR4: 5' *Kpn I* und 3' *Bam HI*). Der 5' Primer für das TLR2 Konstrukt enthielt zudem das Flag-Markerpeptid. Die PCR Produkte wurden zunächst über die jeweiligen Schnittstellen in den pSignal IG plus Vektor, im Leseraster mit C-terminalem humanem (hu) IgGFc, subkloniert, um die cDNAs FlagmrsTLR2-huIgGFc (T2Fc) und FlagmrsTLR4-huIgGFc (T4Fc) zu erhalten (Abb. 4.1). Diese Plasmide dienten dann als Vorlage für eine PCR, bei der über passende Primer (TLR2: Primer 5 und 6, TLR4: Primer 7 und 6) wiederum Restriktionsschnittstellen eingeführt wurden (TLR2: 5' *Bgl II* und 3' *blunt*, TLR4: 5' *Nco I* und 3' *blunt*) um die amplifizierten PCR-Produkte über diese Schnittstellen in den pMT/BiP/V5-His C Expressionsvektor zu klonieren. Der pMT/BiP/V5-His C Vektor verfügt zum einen über den insektenzellspezifischen Metallothionin

Promotor, erlaubt also eine induzierbare Expression, und zum anderen über eine BiP-Signalsequenz, wodurch Proteine in den Überstand sezerniert werden.

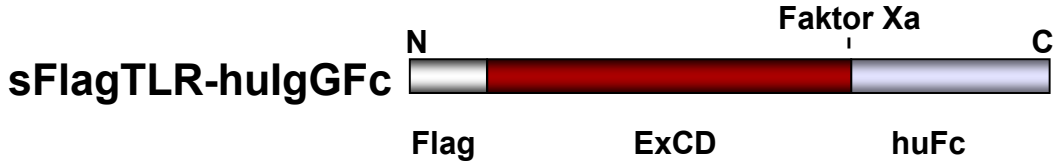


Abb. 4.1: Klonierung des sFlagTLR-huIgGFc Konstruktes. Der extrazelluläre Teil der TLR Rezeptoren wurde durch PCR kloniert und diese cDNA mit einer cDNA fusioniert, die für den Fc-Teil von humanem IgG kodiert. Das N-terminale Ende wurde zudem mit einem Flag-Markerpeptid fusioniert und eine Faktor Xa Schnittstelle erlaubte die Abspaltung des Fc-Teils.

Des Weiteren enthält das Konstrukt (eingeführt mit dem huIgGFc-Teil) eine Faktor Xa Schnittstelle. Bei Faktor Xa handelt es sich um eine Serin-Protease, welche die Aminosäuresequenz Ile-Gln-Gly-Arg erkennt und am C-Terminus von Arg spaltet. Mit diesem Enzym kann nach Expression der huIgGFc-Teil vom restlichen Fusionsprotein abgeschnitten werden.

4.1.1.2 Expression von T2Fc und T4Fc

Für die Expression von T2Fc und T4Fc wurde die Insektenzelllinie S2 gewählt. Einen ersten Überblick über die Expression von T2Fc und T4Fc sollten transient transfizierte S2 Zellen geben. S2 Zellen wurden mit den jeweiligen Expressionsplasmiden transfiziert und anschließend mit Kupfersulfat stimuliert. Nach 3 Tagen wurde jeweils 1ml Überstand abgenommen, mit Protein G immunpräzipitiert und im Anti-Flag Western Blot analysiert. Unter reduzierenden Bedingungen wurden die Fusionsproteine bei 105 kDa (T2Fc) und 125 kDa (T4Fc) detektiert (Daten nicht gezeigt). Um die Fusionsproteine in größeren Mengen zu produzieren, sollten stabile S2 Transfektanden gewonnen werden. Dazu wurden S2 Zellen mit T2Fc oder T4Fc enthaltendem pMT/BiP/V5-His C Expressionsvektor und einem Hygromycin-Vektor (pCoHygro) kotransfiziert und anschließend 4 Wochen mit Hygromycin haltigem Kulturmedium selektioniert. Nach der Selektion wurden die Zellen mit Kupfersulfat stimuliert und die Expression von T2Fc und T4Fc mittels Western Blot überprüft. Nach Immunpräzipitation mit Protein G und anschließendem Anti-Flag Western Blot unter reduzierenden Bedingungen konnten wiederum die Fusionsproteine bei 105 kDa (T2Fc) und 125 kDa (T4Fc) nachgewiesen werden (Abb. 4.2). Als Negativkontrolle dienten mit Kontrollvektor transfizierte S2 Zellen (Mock).

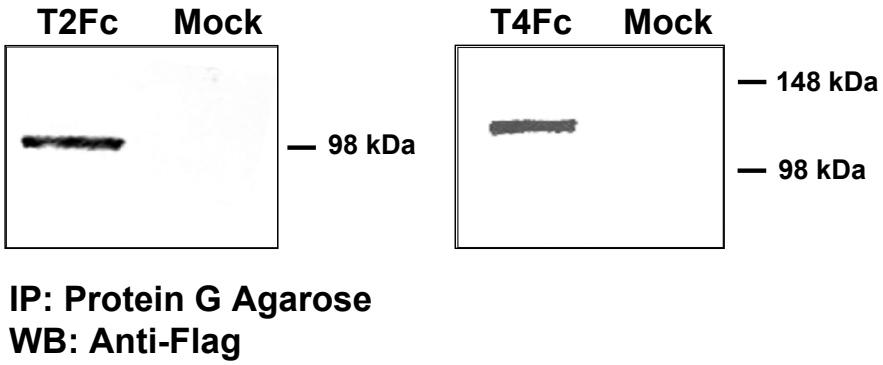


Abb. 4.2: **Expression von T2Fc und T4Fc in S2 Zellen.** Überstände von T2Fc bzw. T4Fc stabil transfizierten S2 Zellen wurden mit Protein G immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate von Kontrollvektor transfizierten Zellen dienten als Negativkontrolle (Mock). Die präzipitierten Proteine wurden im Anti-Flag Western Blot analysiert.

4.1.1.3 Biochemische Charakterisierung von T2Fc und T4Fc

Um die Dimerisierung der Fusionsproteine über den huIgGFc-Teil zu überprüfen, wurden Western Blot Analysen unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Anti-Flag Western Blot unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigte die zu erwartenden Banden von 210 kDa (T2Fc) (Daten nicht gezeigt) und 250 kDa (T4Fc) (Abb. 4.3A). Zur weiteren biochemischen Charakterisierung wurden die Fusionsproteine mit der Protease Faktor Xa verdaut, um den huIgGFc Abschnitt zu entfernen. Verdau und anschließender Anti-Flag Western Blot ließ die zu erwartenden Polypeptidbanden von ca. 80 kDa (T2Fc) (Daten nicht gezeigt) und 100 kDa (T4Fc) (Abb. 4.3B) detektieren. Außerdem wurde zur Identifizierung ein Western Blot gegen den huIgGFc-Teil durchgeführt, welcher auch die charakteristischen Banden von 105 kDa (T2Fc) (Daten nicht gezeigt) und 125 kDa (T4Fc) (Abb. 4.3C) zeigte. Die Daten werden hier exemplarisch nur für T4Fc dargestellt:

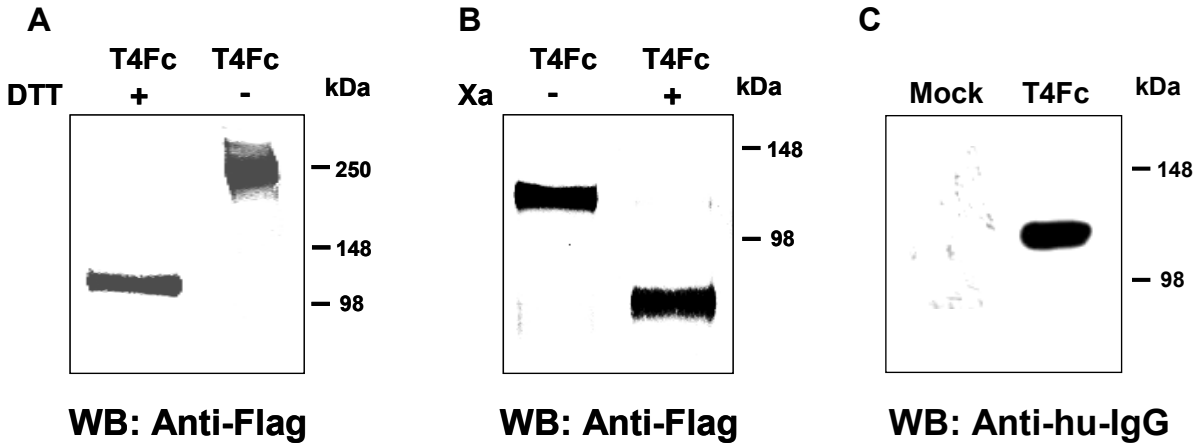


Abb. 4.3: Biochemische Charakterisierung von T4Fc. (A): Überstände von T4Fc transfizierten S2 Zellen wurden mit Protein G immunpräzipitiert, im SDS-Gel unter reduzierenden (+DTT) und unter nicht-reduzierenden Bedingungen (-DTT) aufgetrennt und im Anti-Flag Western Blot analysiert.
(B): Gereinigtes T4Fc (~1 μg) wurde mit und ohne Protease Faktor Xa inkubiert um den huIgGFc-Teil zu entfernen. Nach 24 h Verdau wurden die Proben im SDS-Gel aufgetrennt und im Anti-Flag Western Blot analysiert. (Xa = Protease Faktor Xa)
(C): Überstände von T4Fc- oder Kontrollvektor (Mock) transfizierten S2 Zellen wurden nach Immunpräzipitation mit Anti-Flag im SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit einem Anti-hu-IgG Antikörper detektiert.

4.1.1.4 Reinigung von T2Fc und T4Fc

Zur Reinigung wurde das gegen PBS dialysierte, T2Fc bzw. T4Fc enthaltende Kulturmedium über eine Protein A Säule gereinigt. Eluiert wurde mit Glycin/HCl Puffer pH 4. Die Reinheit der Elutionsfraktionen wurde anschließend durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen mittels Syprored Proteinfärbung überprüft. Die Fraktionen zeigten eine Bande mit einem Molekulargewicht von 105 kDa (T2Fc) bzw. 125 kDa (T4Fc) (Abb. 4.4). Die Proteinkonzentration in den Hauptfraktionen betrug zwischen 50 und 200 μg/ml. Dies entspricht einer Konzentration von ca.10 μg/ml im Überstand transfizierter S2 Zellen.

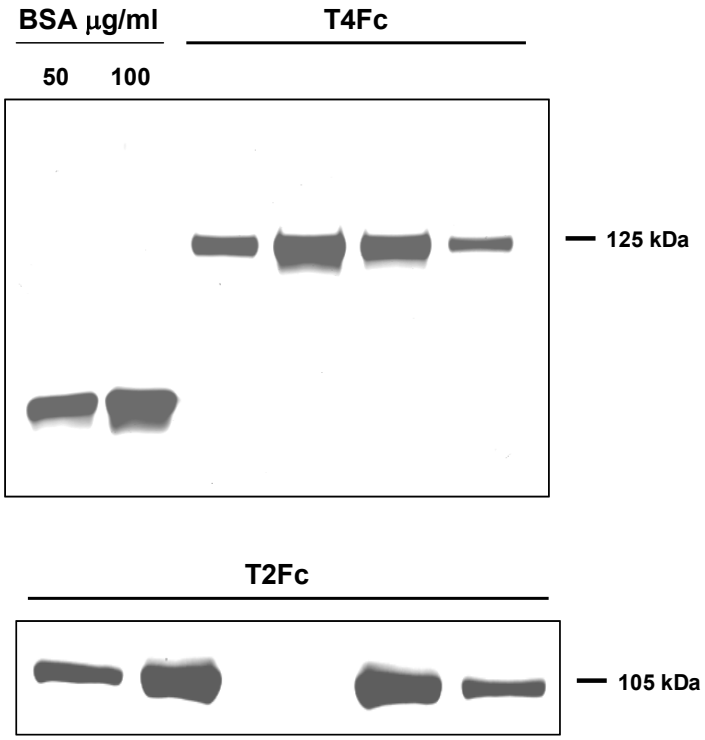


Abb. 4.4: Reinigung von T2Fc und T4Fc über Protein A Agarose. Dialysierter Überstand von T2Fc oder T4Fc transfizierten S2 Zellen wurde über eine Protein A Säule gereinigt. Die einzelnen Elutionsfraktionen nach Protein A Chromatographie wurden im SDS-Gel (oben T4Fc, unten T2Fc) analysiert. Zur Proteinfärbung wurde Syprored protein stain verwendet. BSA wurde als Standard benutzt (Spuren 1 und 2 im oberen SDS-Gel; 50 und 100 µg/ml BSA). Es wurden jeweils gleiche Volumina aufgetragen.

4.1.1.5 Untersuchung des Einflusses von T2Fc und T4Fc auf die proinflammatorische Reaktion von RAW 264.7 nach Stimulierung durch mikrobielle Antigene in vitro

Sobald genügende Mengen rekombinantes T2Fc bzw. T4Fc aus S2 Zellen gereinigt waren, wurde mittels *in vitro*-Experimenten der Einfluss von T2Fc bzw. T4Fc nach Stimulierung durch mikrobielle Zellwandbestandteile auf die IL-6 Produktion in murinen RAW-Zellkulturen untersucht.

4.1.1.5.1 Synergistischer Effekt von T2Fc auf die mit Pam3Cys bzw. LTA induzierte IL-6 Sekretion

Zunächst wurde der Einfluss von T2Fc auf die Signaltransduktion über TLR2 untersucht. Nach Stimulierung der murinen Makrophagen Zelllinie RAW 264.7 mit den TLR 2 Aktivatoren Pam3Cys (Tripalmitoyl-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala) (Abb. 4.5A) oder LTA (Abb. 4.5B) ergab sich überraschenderweise nach Zusatz verschiedener Konzentrationen T2Fc eine synergistische Ausschüttung von proinflammatorischem IL-6.

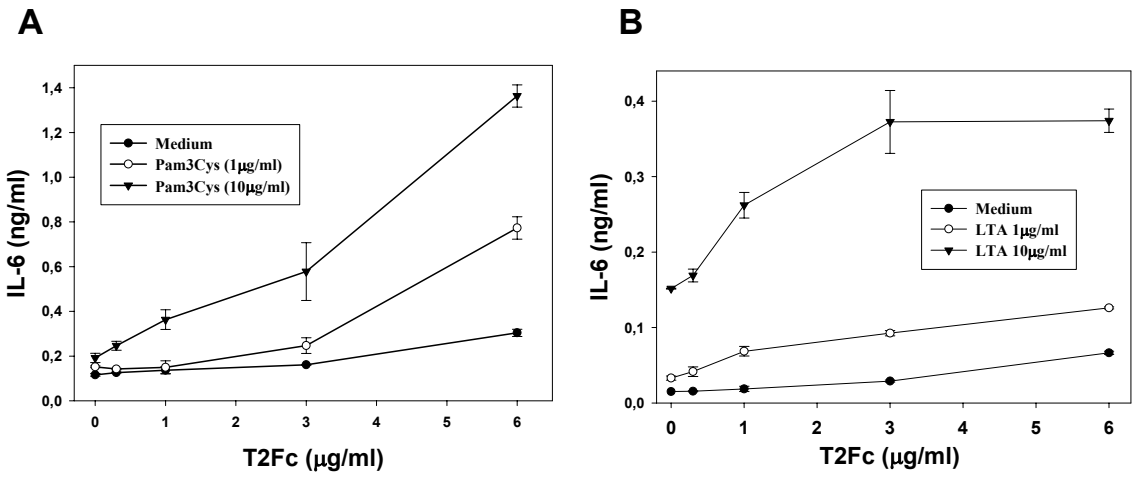


Abb. 4.5: **Messung der biologischen Aktivität von T2Fc.** Zellen der murinen Makrophagen Zelllinie RAW 264.7 wurden mit verschiedenen Konzentrationen T2Fc versetzt und nach 30 min mit verschiedenen Konzentrationen TLR2 Aktivatoren Pam3Cys **(A)** oder LTA **(B)** 12 h stimuliert. Anschließend wurde das Zytokin IL-6 im Überstand mittels ELISA gemessen

Als Negativkontrolle diente T4Fc, welches keinen Effekt auf die Pam3Cys induzierte IL-6 Sekretion zeigte (Daten nicht gezeigt). Um den Einfluss des Fc-Teils zu überprüfen, wurde T2Fc mit Protease Faktor Xa verdaut, um huIgGFc zu entfernen. Anschließend wurde mittels Protein A Chromatographie gereinigt, um unverdautes T2Fc und abgespaltenes Fc zu entfernen und um lösliches TLR2 (sTLR2) zu gewinnen. Nach Zusatz von sTLR2 wurde der gleiche synergistische Effekt auf die Pam3Cys induzierte IL-6 Sekretion in RAW 264.7 beobachtet (Abb. 4.6).

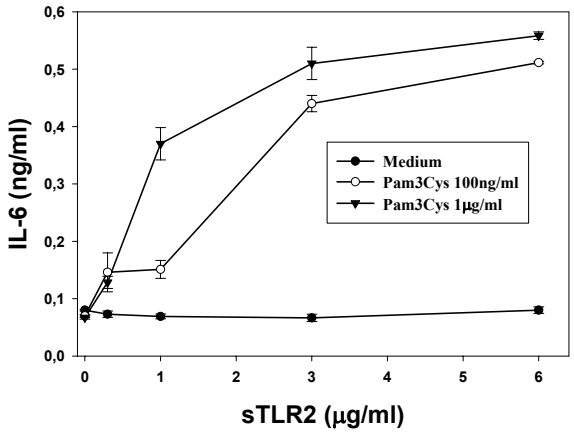


Abb. 4.6: Messung der biologischen Aktivität von sTLR2. RAW 264.7 wurden in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von sTLR2 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 12 h mit Pam3Cys (100 ng/ml bzw. 1 µg/ml) stimuliert und IL-6 in den Überständen mittels ELISA bestimmt.

Der synergistische Effekt ist also nicht auf den huIgGFc-Teil zurückzuführen, sondern scheint spezifisch für lösliches TLR2 zu sein. Außerdem zeigte T2Fc auch keinen Einfluss auf LPS stimulierte IL-6 Sekretion von RAW 264.7 (Daten nicht gezeigt).

4.1.1.5.2 Kein Einfluss von T4Fc auf die LPS induzierte IL-6 Sekretion

Um den Einfluss von T4Fc auf die Signaltransduktion über TLR4 zu untersuchen, wurden RAW 264.7 mit verschiedenen Konzentrationen T4Fc versetzt und mit gereinigtem LPS stimuliert. Nach Zusatz von LPS als TLR 4 Stimulus wurde mit dem rekombinanten Fusionsprotein T4Fc die Ausschüttung von IL-6 nicht moduliert (Abb. 4.7).

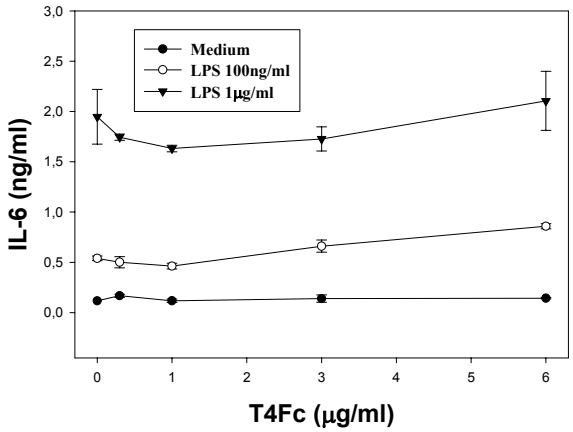


Abb. 4.7: Messung der biologischen Aktivität von T4Fc. Zellen der murinen Makrophagen Zelllinie RAW 264.7 wurden mit verschiedenen Konzentrationen T4Fc versetzt und nach 30 min mit gereinigtem LPS als TLR4 Aktivator 12 h stimuliert. Anschließend wurde das Zytokin IL-6 im Überstand mittels ELISA gemessen.

Um außerdem den Effekt von reinem löslichem TLR4 (ohne huIgGFc) zu überprüfen, wurde das Fusionsprotein T4Fc mit Protease Xa verdaut und über Protein A Chromatographie gereinigt, um unverdautes T4Fc und freies Fc zu entfernen. sTLR4 zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die IL-6 Sekretion von RAW 264.7, welche mit LPS als TLR 4 Stimulus behandelt wurden (Daten nicht gezeigt). Der ausgebliebene erwünschte „Hemmeffekt“ (die Erniedrigung der Produktion proinflammatorischer Zytokine) von T4Fc entsprach nicht unseren Erwartungen, wird aber durch den in der Einleitung genannten neuen Befund, dass freies MD-2 biologisch inaktiv ist, logisch erklärbar.
Die löslichen Rezeptoren T2Fc und T4Fc alleine stimulierten keine IL-6 Sekretion, so dass eine eventuelle Kontamination mit bakteriellen Produkten ausgeschlossen werden konnte.

4.1.1.5.3 Expression von T4Fc in HEK 293 Zellen und Testung seiner biologischen Aktivität

Schließlich sollte ausgeschlossen werden, dass Proteinmodifikationen, wie das Glykosylierungsmuster der S2 Zellen, welches sich von dem der Säugerzellen unterscheidet, mit verursachend für den ausbleibenden Effekt von T4Fc auf LPS stimulierte Mausmakrophagen sind.

Zu diesem Zweck wurde T4Fc in den eukaryotischen Expressionsvektor (p3xFlag-CMV-8) umkloniert, um die Produktion des rekombinanten Proteins in Säugerzellen zu ermöglichen. Der Vektor p3xFlag-CMV-8 trägt den Promotor des humanen Cytomegalieviruses (CMV), der in Säugerzellen eine starke Überexpression induziert. Außerdem verfügt der Vektor über eine Praeprotrypsinsignalsequenz, wodurch die fusionierten Proteine in den Überstand sezerniert werden. Dazu wurde das T4Fc-Fragment ohne das Flag-Markerpeptid (da der eukaryotische Expressionsvektor bereits ein Flag-Markerpeptid enthielt) aus dem pMT/BiP/V5-His C -Expressiosvektor über die Restriktionsschnittstellen *Not I* und *Stu I* ausgeschnitten und in den p3xFlag-CMV-8-Vektor (mit *Not I* und *EcoR V* geschnitten) kloniert. HEK 293 Zellen wurden mit dem Konstrukt T4Fc in p3xFlag-CMV-8 transient transfiziert und die Expression des Fusionsproteins im Anti-Flag Western Blot, nach Immunpräzipitation der Überstände mit Protein G, überprüft.

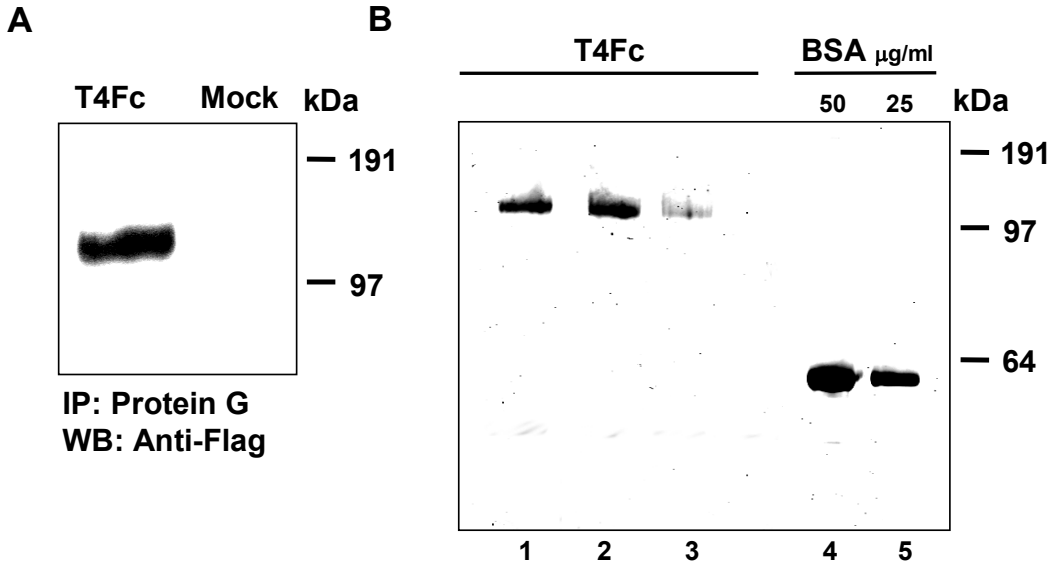


Abb. 4.8: Expression und Reinigung von T4Fc aus HEK 293. (A): HEK 293 Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid T4Fc in p3xFlag-CMV-8 transient transfiziert. Als Kontrolle dienten HEK 293 Zellen, die mit einem Kontrollvektor transfiziert wurden (Mock). Nach 24 h wurden die Überstände mit Protein G immunpräzipitiert und die Präzipitate im Western Blot mit einem Anti-Flag Antikörper detektiert.
(B): T4Fc enthaltenes HEK 293 Kulturmedium wurde über Protein A Affinitätschromatographie gereinigt. Die einzelnen Elutionsfraktionen wurden im SDS-Gel (Färbung: Syprored protein stain) überprüft. BSA wurde als Standard benutzt (Spuren 4 und 5; 50 und 25 µg/ml BSA). Es wurden jeweils gleiche Volumina aufgetragen.

Unter reduzierenden Bedingungen ließ sich im Western Blot T4Fc mit einem Molekulargewicht von ca. 140 kDa detektieren (Abb. 4.8A). Die Unterschiede des Molekulargewichts von T4Fc aus S2 Zellen und aus HEK 293 lassen sich am wahrscheinlichsten auf verschiedene Glykosylierungsmuster zurückführen. Zunächst wurden Überstände von T4Fc enthaltenem HEK 293 Kulturmedium analog zu 4.1.1.4 mit Protein A Affinitätschromatographie gereinigt und die einzelnen Elutionsfraktionen im SDS-Gel analysiert (Abb. 4.8B). T4Fc konnte aus HEK 293 ebenfalls in hoher Reinheit gewonnen werden. Die quantitative Ausbeute des Proteins aus HEK 293 war jedoch deutlich geringer als aus S2 Zellen. In den einzelnen Fraktionen konnten Proteinkonzentrationen bis zu 25 μg/ml erreicht werden. Im Überstand von HEK 293 befand sich demnach ca. 1 μg/ml Fusionsprotein, ein Zehntel der Menge, welche in S2 Zellen produziert wurde. Nach Reinigung großer Mengen Überstand konnte genügend T4Fc gewonnen werden, um den Einfluss dieses Proteins auf die proinflammatorische Entzündungsreaktion in Mausmakrophagen zu testen. Dazu wurden analog zu 4.1.1.5.2 RAW 264.7 mit verschiedenen Konzentrationen T4Fc versetzt und 12 h mit gereinigtem LPS (100 ng/ml und 1 μg/ml) stimuliert. Anschließend wurde IL-6 in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Auf Zusatz von T4Fc aus HEK 293 zeigte sich ebenfalls kein Einfluss auf die IL-6 Sekretion nach LPS Stimulierung (Daten nicht gezeigt). Spezifische Proteinmodifikationen der S2 Zellen sind somit nicht verantwortlich für die ausbleibenden Effekte von T4Fc.

4.1.2 Der Komplex aus T4Fc und MD-2 hemmt LPS Aktivität *in vitro*

Essentiell für den erwünschten „Hemmeffekt“ von löslichem TLR4 wäre die Ausbildung des T4Fc/MD-2 Komplexes, der für die LPS Signaltransduktion entscheidend ist (Re & Strominger, 2002) (Abb. 4.9). Über Immunpräzipitation mit dem monoklonalen Antikörper MTS 510 (Akashi *et al*, 2000), welcher spezifisch den Komplex TLR4/MD-2, jedoch keines der Moleküle alleine erkennt, konnte der T4Fc/MD-2 Komplex im Überstand von RAW 264.7, nach Zugabe von gereinigtem T4Fc, nicht nachgewiesen werden. Vermutlich ist dies auf die ungenügende Produktion oder Inaktivierung von MD-2 (Kennedy *et al*, 2004) zurückzuführen. Deshalb wurde als nächster Schritt rekombinantes MD-2 hergestellt, um die Funktionalität von löslichem TLR4 zu überprüfen.

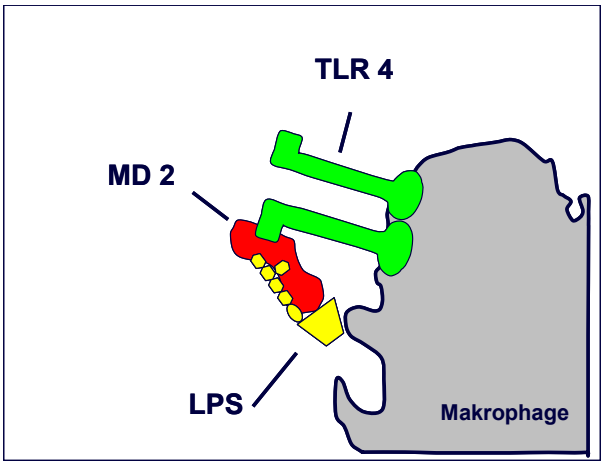


Abb. 4.9: Eine effiziente Signaltransduktion über TLR4 benötigt MD-2. (Latz *et al*, 2002; Visintin *et al*, 2003). MD-2 alleine kann LPS binden (Re & Strominger, 2002), jedoch wird diese Bindung durch die Anwesenheit von TLR4 wesentlich verstärkt (Visintin *et al*, 2003).

4.1.2.1 Rolle von MD-2

4.1.2.1.1 Expression von MD-2

HEK 293 Zellen wurden mit einem Expressionsvektor, der Flag-markiertes Maus MD-2 kodiert und außerdem eine Praeprotrypsin-Signalsequenz enthielt (von Werner Falk, Regensburg, zur Verfügung gestellt), transfiziert. Nach 24 h wurde das Fusionsprotein Flag-MD-2 (MD-2) im Überstand über den Flag-Marker nachgewiesen. MD-2 liegt als Glykoprotein in 3 bekannten Formen zwischen 20 und 30 kDa vor (Visintin *et al*, 2001). Im Anti-Flag Western Blot wurden 2 Glykoformen zwischen 20 und 30 kDa nachgewiesen (Abb. 4.10). Die Negativkontrolle zeigt Überstände von Kontrollvektor transfizierten HEK 293 Zellen.

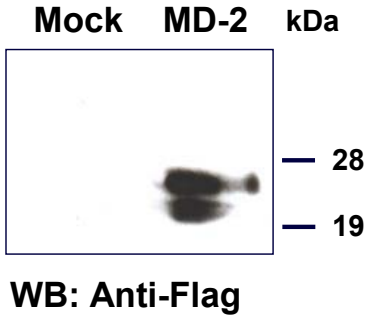


Abb. 4.10: Expression von MD-2 in HEK 293 Zellen. HEK 293 Zellen wurden mit MD-2 bzw. einem Kontrollvektor (Mock) transfiziert. Nach 24 h wurden die Überstände im SDS-Gel aufgetrennt und im Anti-Flag Western Blot analysiert.

4.1.2.1.2 Nachweis des T4Fc/MD-2 Komplexes

Da für die Funktionalität des LPS-Rezeptor Komplexes eine Bindung von T4Fc an MD-2 essentiell ist, sollte dies überprüft werden. HEK 293 Zellen wurden mit MD-2 und T4Fc (in

p3xFlag-CMV-8) in verschiedenen DNA-Mengenverhältnissen kotransfiziert und die Überstände mit Anti-Flag Agarose immunpräzipitiert (Abb. 4.11). Im Anti-Flag Western Blot wurden die Präzipitate anschließend untersucht. Zunächst sollte das optimale DNA-Verhältnis ermittelt werden, um eine gleichmäßige Expression beider Proteine zu erlauben.

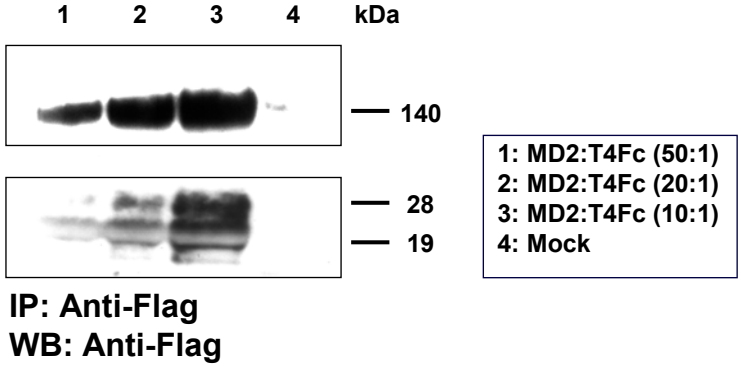


Abb. 4.11: Kotransfektionen von MD-2 und T4Fc in HEK 293 Zellen. HEK 293 Zellen wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen MD-2:T4Fc kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Überstände mit Anti-Flag Agarose immunpräzipitiert und die Expression beider Proteine im Anti-Flag Western Blot untersucht.

Der Anteil von MD-2 musste deutlich höher sein als der von T4Fc um eine annähernd gleiche Expression zu erreichen. Dies ist eventuell durch die Instabilität von MD-2 logisch erklärbar (Kennedy *et al*, 2004). Das Verhältnis 10: 1 (FlagMD-2: T4Fc) schien für die gleichmäßige Expression geeignet und wurde auch in allen folgenden Kotransfektionsexperimenten eingesetzt.

Um nun die Bindung von T4Fc an MD-2 zu überprüfen, wurden Überstände von kotransfizierten HEK 293 Zellen mit Protein G immunpräzipitiert und anschließend T4Fc und MD-2 anhand ihres Molekulargewichtes im Anti-Flag Western Blot identifiziert (Abb. 4.12). Als Negativkontrolle dienten mit Kontrollvektor transfizierte HEK 293 Zellen.

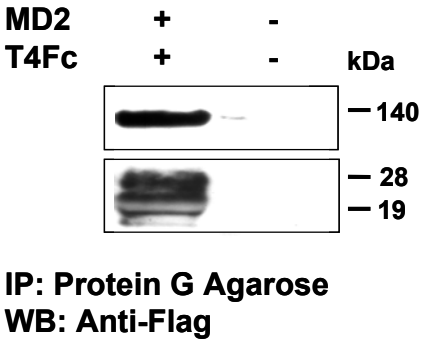


Abb. 4.12: Nachweis der Bindung von T4Fc an MD-2. HEK 293 Zellen wurden mit T4Fc und MD-2 kotransfiziert. Mit Kontrollvektor transfizierte HEK 293 dienten als Negativkontrolle (Mock). Überstände wurden mit Protein G immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden im SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit einem Anti-Flag Antikörper detektiert.

MD-2 wurde über T4Fc kopräzipitiert, T4Fc bindet also an MD-2 und ist somit biologisch aktiv.

4.1.2.2 Der Komplex aus T4Fc und MD-2 bindet LPS

In Serum interagiert LPS mit LBP, dies bindet wiederum an CD14, das löslich oder membranständig sein kann, und wird dann auf den TLR4/MD-2 Komplex übertragen. In Bindungsstudien mit biotinyliertem LPS, rekombinanten LBP und CD14 kann die Frage geklärt werden, ob der Komplex T4Fc/MD-2 an LPS bindet. Die Substanzen werden in den entsprechenden Kombinationen inkubiert und dann mit Streptavidin Sepharose gefällt. Die Präzipitate werden auf einem Polyacrylamidgel getrennt, und die Anwesenheit der Proteine wird durch den Flag-Marker nachgewiesen. Für diesen so genannten „LPS Pull-down assay“ (Visintin *et al*, 2003) wird biotinyliertes LPS benötigt, das zunächst hergestellt wurde.

4.1.2.2.1 Herstellung von biotinyliertem LPS

Die Biotinylierung von gereinigtem LPS wurde mit Hilfe des PIERCE-EZ-Link-Kit durchgeführt. Nach erfolgter Koppelung von Biotin an LPS mit Hilfe eines Biotinhydrazides wurde die Effektivität dieser Kupplungsreaktion im Western Blot überprüft. Biotinyliertes LPS (Biotin-LPS) wurde im SDS-Gel aufgetrennt und über Streptavidin-HRP detektiert. Als Negativkontrolle wurde gereinigtes LPS verwendet, welches nicht an Biotin gekuppelt wurde (Abb. 4.13).

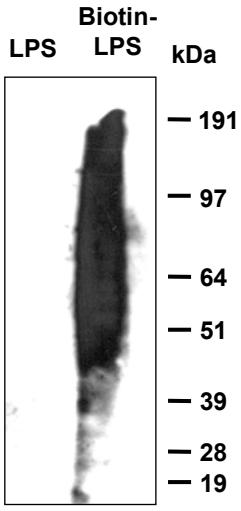


Abb. 4.13: Überprüfung der Biotinylierung von LPS mittels Western Blot. Biotinyliertes LPS (Biotin-LPS) und gereinigtes LPS wurden im SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot über Streptavidin- HRPgefärbt.

Im Unterschied zu gereinigtem LPS wurde biotinyliertes LPS über Streptavidin-HRP detektiert. LPS konnte also über das Biotinhydrazid biotinyliert werden. Da LPS ein

heterogenes Gemisch ist, findet sich im Western Blot keine definierte Bande, sondern eine Vielzahl an Banden, welche charakteristisch für die verschiedenen LPS-Formen sind.

4.1.2.2.2 „LPS Pull-down assay“

Mit dem hergestellten biotinylierten LPS konnte nun der „LPS Pull-down assay“ durchgeführt werden, um die Interaktion des T4Fc/MD-2 Komplexes mit LPS zu untersuchen.
Jeweils 3 ml Überstand von T4Fc und/oder MD-2 transfizierten HEK 293 Zellen wurden mit biotinyliertem LPS (ca. 1 μg) für 1 h inkubiert und mit Streptavidin Sepharose eine weitere Stunde immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-Flag Antikörper im Western Blot. T4Fc und MD-2 wurden anhand ihres Molekulargewichtes identifiziert. In kotransfizierten HEK 293 Zellen (mit T4Fc und MD-2 transfiziert), konnten beide Proteine im Anti-Flag Western Blot nachgewiesen werden. Biotinyliertes LPS bindet also den Komplex aus T4Fc und MD-2 (Abb. 4.14, linke Spur). T4Fc alleine interagierte nicht mit LPS (Abb. 4.14, rechte Spur), wohingegen MD-2 über biotinyliertes LPS immunpräzipitiert wurde (Abb. 4.14, mittlere Spur). Es fand also eine direkte Interaktion zwischen MD-2 und LPS statt.

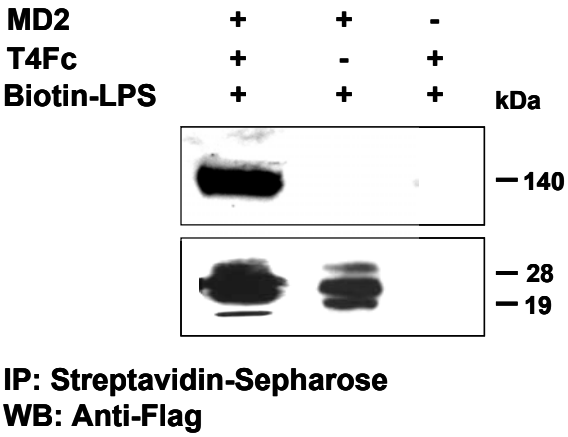


Abb. 4.14: Nchweis der Bindung von T4Fc/MD-2 an LPS. Überstände von HEK 293 Zellen, transfiziert mit T4Fc und/oder MD-2, wurden mit biotinyliertem LPS inkubiert. Die Komplexe wurden dann mit Streptavidin Sepharose immunpräzipitiert, im SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot über das Flag-Epitop detektiert.

Diese Koimmunpräzipitationsstudien zeigten, dass der Komplex aus löslichem TLR4 und MD-2 LPS binden kann.

4.1.2.3 Der Komplex aus T4Fc/MD-2 hemmt die LPS induzierte IL-6 Sekretion in RAW 264.7 *in vitro*

Löslicher TLR4 zeigte keinen Einfluss auf die LPS-induzierte IL-6 Sekretion in RAW 264.7 (siehe 4.1.1.5.2). Dieser Effekt wird logisch durch die Tatsache erklärbar, dass T4Fc aus Mangel an MD-2 kein LPS binden kann. Da der Komplex aus löslichem TLR4 und MD-2 die Fähigkeit besitzt, LPS zu binden, sollte nun untersucht werden, ob dieser Komplex auch LPS Aktivität neutralisieren kann.

HEK 293 Zellen wurden daher mit T4Fc und MD-2 kotransfiziert und per Größenausschlusschromatographie (Ausschlussgewicht 10 kDa) konzentriert. Zur Kontrolle wurden HEK 293 Zellen mit einem Kontrollplasmid transfiziert und ebenfalls per Größenausschlusschromatographie konzentriert. Zunächst wurden die konzentrierten Überstände im SDS-Gel und anschließendem Anti-Flag Western Blot untersucht.

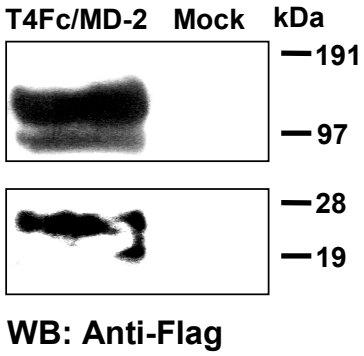


Abb. 4.15: Konzentrierung des T4Fc/MD-2 Komplexes. Überstände von kotransfizierten (T4Fc/MD-2) bzw. mit Kontrollvektor transfizierten (Mock) HEK 293 Zellen wurden per Größenausschlusschromatographie konzentriert. Die Konzentrate wurden im Anti-Flag Western Blot analysiert.

Abb. 4.15 zeigt die zu erwartenden Polypeptidbanden von ungefähr 120 kDa für T4Fc und 20-30 kDa für MD-2, welche in dem konzentrierten Kontrollüberstand nicht nachzuweisen waren. Um den Effekt dieses Komplexes auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion zu untersuchen, wurden RAW 264.7 Zellen mit den konzentrierten Überständen 30 min vorinkubiert. Anschließend wurde mit 100 ng/ml LPS stimuliert, und IL-6 im Überstand nach 12 h mittels ELISA gemessen. Abb. 4.16 zeigt eine signifikante dosisabhängige Hemmung der IL-6 Produktion bei Vorinkubation der RAW 264.7 Zellen mit dem T4Fc/MD-2 Komplex, jedoch nicht mit dem Kontrollüberstand ($p < 0.05$ für relative Konzentration 1; $p < 0,01$ für alle anderen Konzentrationen).

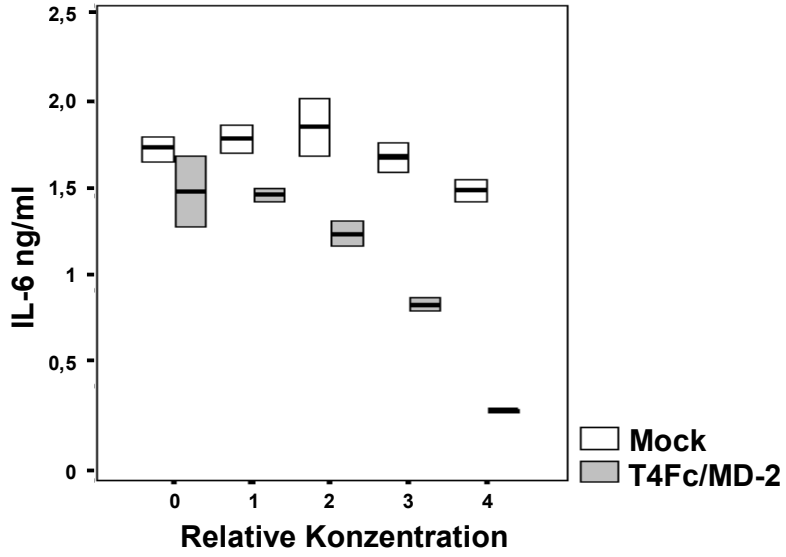


Abb. 4.16: Messung der biologischen Aktivität von T4Fc/MD-2. RAW 264.7 Zellen wurden mit den angegebenen Verdünnungen konzentrierter Überstände von HEK 293 Zellen, jeweils mit T4Fc und MD-2 oder mit Kontrollvektor (Mock) transfiziert, versetzt. Nach 30 min wurden die Zellen 12 h mit 100 ng/ml LPS stimuliert und IL-6 im Überstand mittels ELISA gemessen.

Der Komplex T4Fc/MD-2 alleine zeigte keine Aktivität (Daten nicht gezeigt), so dass keine Kontamination mit bakteriellen Produkten vorliegt. Somit kann der Komplex aus T4Fc und MD-2 nicht nur LPS binden, sondern auch LPS Aktivität *in vitro* hemmen.

4.1.2.4 Generierung des T4Fc/MD-2 Komplexes *in vitro*

In einem ersten Ansatz sollte MD-2 in größeren Mengen und ausreichender Reinheit gewonnen werden, um dann mit gereinigtem T4Fc den LPS-bindenden Rezeptorkomplex zu bilden. Zu diesem Zweck sollte MD-2 in S2 Zellen exprimiert und gereinigt werden. In einem zweiten Ansatz sollte der LPS-Rezeptor Komplex in einem Molekül generiert werden (siehe 4.1.3).

4.1.2.4.1 Klonierung und Expression von MD-2 in S2 Zellen

Zunächst wurde ein Expressionsvektor konstruiert, der zur Produktion und Sekretion von FlagMD-2 in den Überstand stabil transfizierter S2 Zellen führt.

MD-2 wurde mittels PCR mit geeigneten Primern kloniert, wobei als Vorlage das Plasmid Flag-MD-2 diente. Über die verwendeten Primer (5 und 11) wurden Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Bgl II* und *Age I* in das PCR Fragment eingeführt. Durch diese Schnittstellen wurde die amplifizierte cDNA in den Expressionsvektor pMT/BiP/V5-His C kloniert. Dieser Vektor enthält neben dem insektenzellspezifischen Metallothionin Promotor,

eine BiP Signalsequenz (unter 4.1.1.1. erläutert) und ein C-terminales His-Markerpeptid, welches die Isolierung des Fusionsproteins durch Affinitätschromatographie erlaubt.
Stabile S2 Transfektanden wurden analog zu 4.1.1.2. gewonnen. Zunächst wurde der Überstand stabiler S2 Transfektanden im Anti-Flag Western Blot analysiert und die Expression von Flag-MD-2-His überprüft. Im Western Blot waren verschiedene Glykoformen zwischen 20 und 30 kDa zu erkennen (Abb. 4.17A). Zur eindeutigen Charakterisierung wurde das Fusionsprotein außerdem im Anti-His Western Blot detektiert, der ein ähnliches Bandenmuster aufzeigte (Abb. 4.17B).

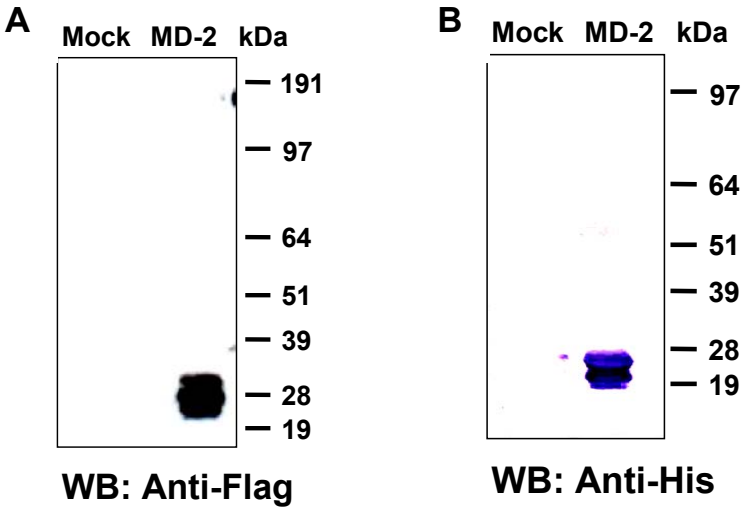


Abb. 4.17: Expression von MD-2 in S2 Zellen. S2 Zellen wurden mit Flag-MD-2-His (MD-2) stabil transfiziert. Anschließend wurden die Überstände im Western Blot mit einem Anti-Flag Antikörper **(A)** bzw. mit einem Anti-His Antikörper **(B)** analysiert. Mit Kontrollvektor transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle (Mock).

4.1.2.4.2 Reinigung von Flag-MD-2-His

Rekombinantes Flag-MD-2-His wurde über Affinitätschromatographie mit chelatbindender Sepharose gereinigt. Kulturmedium mit Flag-MD-2-His wurde auf eine Säule mit chelatbindender Sepharose aufgetragen, gewaschen und mit verschiedenen Imidazolkonzentrationen eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-Gel analysiert. Abb. 4.18 zeigt die Überprüfung der Elutionsfraktionen nach der Affinitätschromatographie.

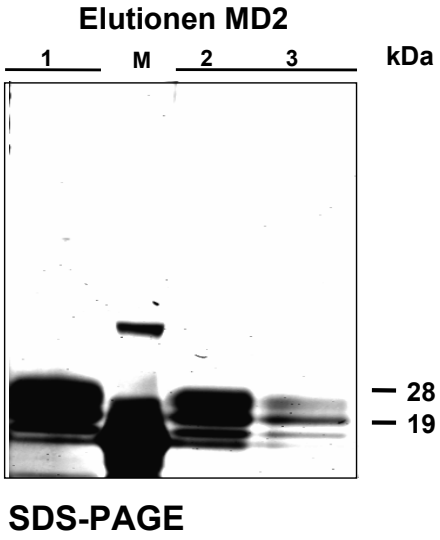


Abb. 4.18: Reinigung von MD-2 über chelatbindende Sepharose. Flag-MD-2-His enthaltendes S2 Kulturmedium wurde über chelatbindende Sepharose gereinigt. Die Elution erfolgte mit 10 mM (Fraktionen 1 und 2) bzw. 50 mM (Fraktion 3) Imidazol. Anschließend wurden die Elutionsfraktionen im SDS-Gel (Färbung: Syprored) auf Reinheit überprüft.
M= Proteinstandard

Im SDS-Gel konnte Flag-MD-2-His wiederum in verschiedenen Glykoformen zwischen 20 und 30 kDa mittels Syprored Proteinfärbung nachgewiesen werden. Die Elution erfolgte mit 10 mM Imidazol (Fraktionen 1 und 2). Mittels quantitativer Proteinbestimmung konnte in den einzelnen Elutionsfraktionen Konzentrationen von ca. 50 μg/ml – 100 μg/ml nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Konzentration von ca. 4 μg/ml im Überstand stabil transfizierter Zellen. Das Fusionsprotein Flag-MD-2-His wurde also in hoher Reinheit und ausreichender Menge erhalten.

4.1.2.4.3 Biologische Aktivität von Flag-MD-2-His

MD-2 verfügt über 7 Cystein Reste und besteht deshalb größtenteils aus einer heterogenen Sammlung großer, über Disulfidbrücken verknüpfter Oligomere (Visintin *et al*, 2001). Jedoch scheint nur die monomere Form an LPS zu binden und somit biologisch aktiv zu sein (Re & Strominger, 2002). Zunächst wurde daher untersucht, in welcher Form das gereinigte rekombinante Flag-MD-2-His vorliegt und ob dieses Fusionsprotein T4Fc binden kann.
Western Blot Analysen mit einem Anti-Flag Antikörper unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigten, dass kaum monomeres Flag-MD-2-His vorliegt (Abb. 4.19A, linke Spur); unter reduzierenden Bedingungen (Abb. 4.19A, rechte Spur) findet man erwartungsgemäß nur monomeres Flag-MD-2-His. Der Großteil des Proteins bestand also aus Oligomeren, welche über Disulfidbrücken verknüpft waren.

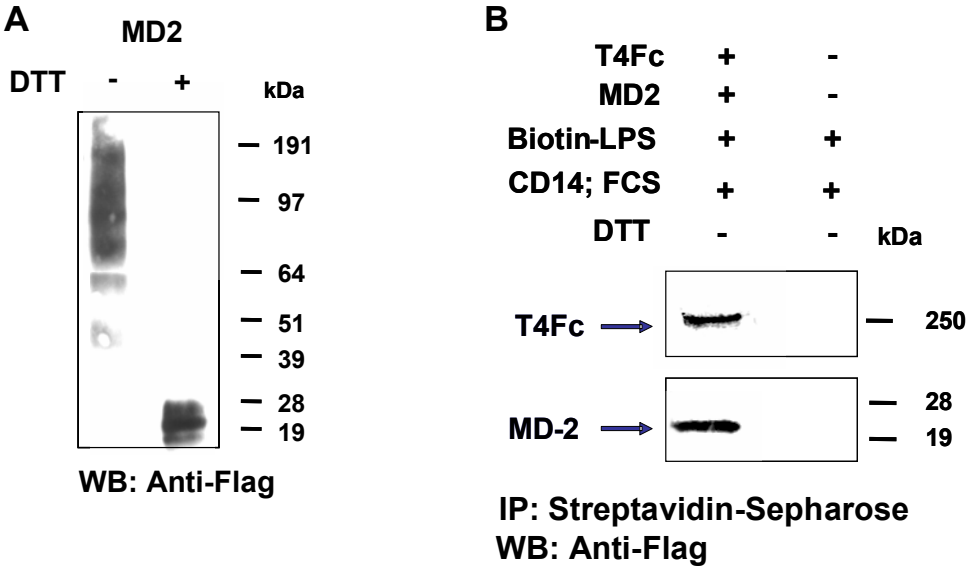


Abb. 4.19: Biologische Aktivität von MD-2. (A): Gereinigtes Flag-MD-2-His aus S2 Zellen wurde im Anti-Flag Western Blot unter reduzierenden (+ DTT) und unter nicht-reduzierenden (- DTT) Bedingungen untersucht.
(B): Die rekombinanten Fusionsproteine T4Fc und Flag-MD-2-His wurden mit biotinyliertem LPS (Biotin-LPS), CD14 und FCS inkubiert und anschließend mit Streptavidin Sepharose immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden im SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot unter nicht-reduzierenden (- DTT) Bedingungen über das Flag-Epitop detektiert. Als Negativkontrolle wurde der „LPS Pull-down assay" ohne T4Fc und Flag-MD-2-His durchgeführt.

Um zu identifizieren, welche Formen des heterogenen Flag-MD-2-His Gemisches TLR4 und LPS binden können, wurde der „LPS Pull-down assay" und anschließend ein Anti-Flag Western Blot unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

Rekombinantes gereinigtes T4Fc und Flag-MD-2-His (jeweils 1 μg) wurden mit biotinyliertem LPS (ca. 1 μg), 10% FCS und sCD14 (1 μg) 1 h inkubiert. Anschließend wurde für 1 h mit Streptavidin Sepharose immunpräzipitiert. Als Negativkontrolle diente der „LPS Pull-down assay" ohne die rekombinanten Proteine T4Fc und Flag-MD-2-His. Die Immunpräzipitate wurden dann im Anti-Flag Western Blot unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. Es konnte das dimere T4Fc (ca. 240 kDa) und die monomere Form von MD-2 nachgewiesen werden (Abb. 4.19B). Biotinyliertes LPS interagiert also mit den beiden rekombinanten Proteinen. Jedoch ist die biologisch aktive Komponente das monomere MD-2, welches in dem oben beschriebenen Herstellungsverfahren nur einen sehr geringen Anteil ausmacht.

Somit liefert die Produktion von Flag-MD-2-His in S2 Zellen ein Protein ausreichender Menge und hoher Reinheit, jedoch ist der Großteil des Proteins wegen Bildung von Polymeren biologisch inaktiv und komplexiert kaum mit T4Fc.

4.1.3 Das Designermolekül LPS-Trap neutralisiert LPS Aktivität *in vitro*

Nachdem sich die Herstellung großer Mengen MD-2 wegen seiner Instabilität (Kennedy *et al*, 2004) und Bildung von inaktiven, heterogenen Oligomeren als schwierig erwies, sollte nun in einem zweiten Ansatz der LPS-Rezeptor Komplex in einem Molekül produziert werden. Dazu wurde das T4Fc Fusionsprotein weiterentwickelt und mit Hilfe eines flexiblen Peptidlinkers ein TLR4-MD-2-Fusionsprotein hergestellt. Wir nennen dieses Designermolekül LPS-Trap.

4.1.3.1 Generierung der LPS-Trap

Da über die native Konformation des Komplexes wenig bekannt ist, wurden 2 TLR4-MD-2-Fusionsproteine hergestellt, die sich in ihren C-Termini unterscheiden. Die beiden LPS-Trap-Fusionsproteine verfügen über ein N-terminales Flag-Markerpeptid und ein C-terminales His-Markerpeptid (LPS-Trap) bzw. einen huIgGFc-Teil (LPS-Trap-Fc) (Abb. 4.20). Die LPS-Trap-Fc wurde generiert, um eine Dimerisierung des TLR4/MD-2 Komplexes über den Fc-Teil zu ermöglichen. Außerdem ist die Halbwertszeit von Fc-Proteinen im Serum deutlich länger, was für spätere *in vivo* Versuche von Bedeutung sein könnte.

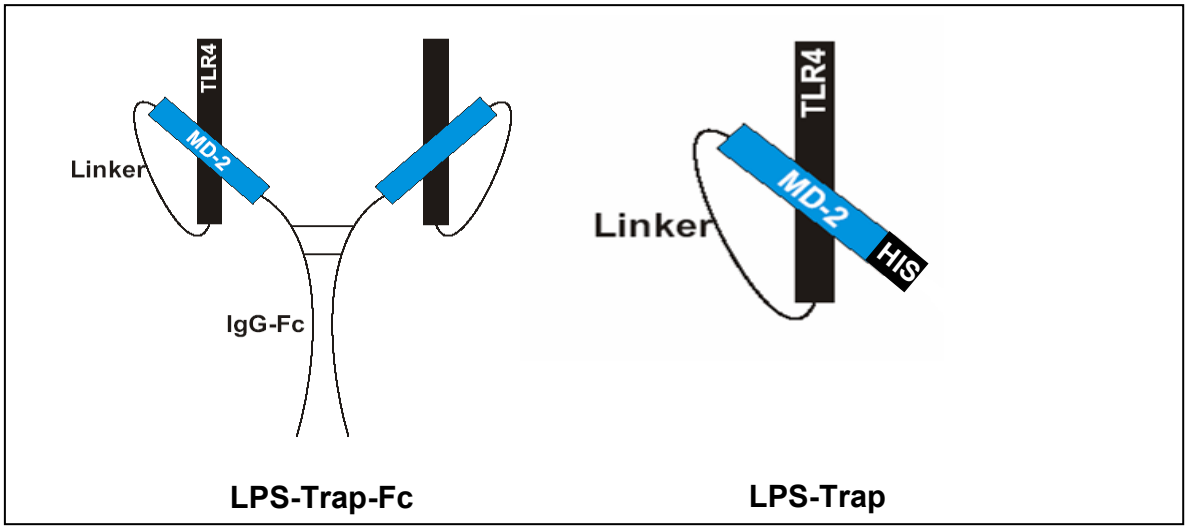


Abb. 4.20: Schematische Darstellung der rekombinanten Fusionsproteine LPS-Trap und LPS-Trap-Fc. Die Konstrukte enthalten den gesamten Extrazellularteil von TLR4, welcher über einen flexiblen Linker an MD-2 fusioniert ist. Es wurden 2 Produkte mit unterschiedlichen C-Termini (His oder huIgGFc), LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc, konstruiert.

4.1.3.1.1 Klonierung der LPS-Trap und LPS-Trap-Fc für die Expression in S2 Zellen

Für die Konstruktion der LPS-Trap wurden 3 cDNA Fragmente hergestellt, der Extrazellularteil von TLR4, ein flexibler Linker und MD-2. Alle 3 Fragmente wurden dann in einem Schritt in den pMT/BiP/V5-His C Expressionsvektor kloniert.

Für das erste Fragment wurde der gesamte extrazelluläre Bereich von TLR4 mittels PCR kloniert. Als Vorlage diente ein Flag-TLR4 Plasmid. Über die Primer (8 und 9) wurde am 5`-Ende eine *Nco I* und am 3`-Ende eine *Spe I* Schnittstelle eingefügt. Das cDNA Fragment, welches den flexiblen Linker kodiert, wurde über Hybridisierung von Oligonukleotiden (12 und 13) gewonnen. Diese enthielten die passenden Schnittstellen *Spe I* (5´-Ende) und *Xho I* (3`-Ende). Das dritte Fragment (MD-2) wurde wiederum mittels PCR amplifiziert. Als Vorlage diente ein Flag-MD-2 Expressionsplasmid. Durch die Wahl der Primer (10 und 11) wurde am 5`-Ende eine *Xho I* und am 3`-Ende eine *Age I* Schnittstelle eingeführt. Außerdem wurden die Primer so gewählt, dass die resultierende MD-2 cDNA kein Stop-Codon enthielt. Diese drei Fragmente wurden nun in den pMT/BiP/V5-His C Expressionsvektor kloniert, im Leseraster mit dem C-terminalen His-Markerpeptid. Der pMT/BiP/V5-His C Vektor wurde zuvor mit *Nco I* und *Age I* verdaut.
Zur Klonierung der LPS-Trap-Fc wurde der huIgGFc-Teil mittels PCR amplifiziert, wobei die Schnittstellen *Age I* und *Sal I* über die Primer (14 und 15) eingeführt wurden. Als Vorlage diente das Plasmid pSignal IG plus. Der huIgGFc-Teil wurde dann über diese Schnittstellen in den Expressionvektor LPS-Trap in pMT/BiP/V5-His C kloniert.

4.1.3.1.2 Klonierung der LPS-Trap und LPS-Trap-Fc für die Expression in eukaryotischen Zellen

Für die Expression in HEK 293 Zellen, CHO Zellen und COS-7 Zellen, wurde die LPS-Trap und die LPS-Trap-Fc in die Expressionsvektoren p3xFlag-CMV-9 bzw. p3xFlag-CMV-8 umkloniert. Beide Vektoren verfügen über einen CMV Promotor und eine Praeprotrypsin-Signalsequenz, die Fusionsproteine werden also in den Überstand sezerniert.
Das Konstrukt LPS-Trap in pMT/BiP/V5-His C wurde über *Not I* und *BamH I* ausgeschnitten und über diese Restriktionsschnittstellen in den Vektor p3xFlag-CMV-9 kloniert. Das LPS-Trap-Fc Konstrukt wurde über die Restriktionsschnittstellen *Not I* und *Sal I* in den p3xFlag-CMV-8 Expressionsvektor kloniert.

4.1.3.1.3 Expression der LPS-Trap und LPS-Trap-Fc in S2 Zellen

Stabil transfizierte S2 Zellen wurden analog zu 4.1.1.2. gewonnen und die Expression der Fusionsproteine LPS-Trap und LPS-Trap-Fc im Western Blot nachgewiesen. Der Überstand (1 ml) von stabil transfizierten S2 Zellen wurden mit Anti-Flag Agarose immunpräzipitiert. Western Blot Analyse unter reduzierenden Bedingungen zeigte eine Bande für die LPS-Trap bei ca. 100 kDa und eine Bande für die LPS-Trap-Fc bei ca. 150 kDa (Abb. 4.21).

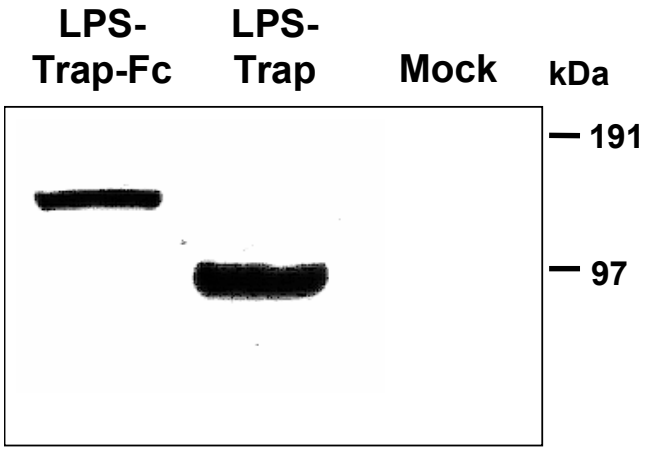


Abb. 4.21: Expression von LPS-Trap-Fc und LPS-Trap in S2 Zellen. S2 Zellen wurden mit LPS-Trap-Fc, LPS-Trap oder Kontrollvektor (Mock) stabil transfiziert. Nach Stimulierung mit Kupfersulfat wurden die Überstände mit Anti-Flag Agarose immunpräzipitiert und im Anti-Flag Western Blot analysiert.

4.1.3.1.4 Expression der LPS-Trap und LPS-Trap-Fc in HEK 293 Zellen

Für die Expression in Säugerzellen wurden HEK 293 Zellen mit den Konstrukten LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc transient transfiziert, und die Überstände wurden im Anti-Flag Western Blot analysiert. Die Banden für die LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc waren geringfügig größer als diejenigen aus den S2 Zellen. Dies ist am ehesten auf unterschiedliche Glykosylierungsmuster der unterschiedlichen Zelltypen zurückzuführen. In HEK 293 Zellen ließ sich die LPS-Trap bei ca. 110 kDa und die LPS-Trap-Fc bei ca. 160 kDa nachweisen (Abb. 4.22).

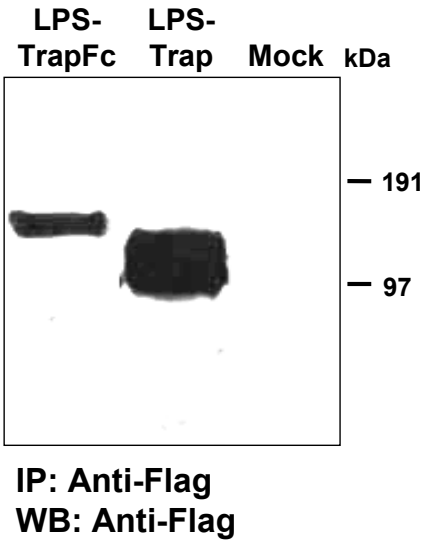


Abb. 4.22: Expression von LPS-Trap-Fc und LPS-Trap in HEK 293 Zellen. HEK 293 Zellen wurden transient mit LPS-Trap-Fc, LPS-Trap oder Kontrollvektor (Mock) transfiziert. Nach 24h wurden die Überstände mit Anti-Flag Agarose immunpräzipitiert und im Anti-Flag Western Blot analysiert.

4.1.3.1.5 Reinigung der LPS-Trap und LPS-Trap-Fc

LPS-Trap enthaltendes S2-Kulturmedium wurde über Affinitätschromatographie mit chelatbindender Sepharose gereinigt (analog zu 4.1.2.4.2). Die Elution erfolgte mit Puffern verschiedener Imidazolkonzentration. Die LPS-Trap wurde mit 10 mM und 50 mM Imidazol eluiert. Die verschiedenen Elutionsfraktionen wurden dann im SDS-Gel analysiert und auf Reinheit überprüft. Abb. 4.23 zeigt konsekutive Fraktionen nach Affinitätschromatographie mit chelatbindender Sepharose. Die Elutionen 1 und 2 enthalten 10 mM Imidazol, die Elutionen 3 und 4 50 mM Imidazol.

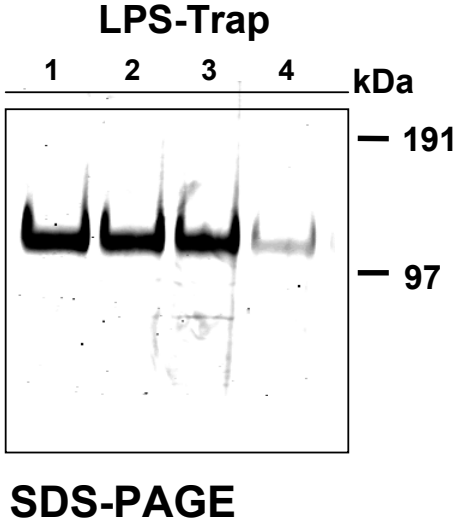


Abb. 4.23: Reinigung von LPS-Trap über chelatbindende Sepharose. LPS-Trap enthaltendes S2 Kulturmedium wurde über chelatbindende Sepharose gereinigt. Das Fusionsprotein wurde mit verschiedenen Imidazolkonzentrationen (Elutionsfraktion 1 und 2: 10mM Imidazol, Elutionsfraktionen 3 und 4: 50mM Imidazol) eluiert. Die Elutionsfraktionen (1-4) wurden im SDS-Gel analysiert (Proteinfärbung: Syprored).

Per quantitativer Proteinbestimmung wurden die Konzentrationen der einzelnen Fraktionen ermittelt. Elutionsfraktionen 1 bis 3 enthielten jeweils 10 μg/ml LPS-Trap, dies lässt auf eine Konzentration von 300 ng/ml LPS-Trap im Überstand von S2 Zellen schließen. Um vernünftige *in vivo* Experimente durchzuführen, müsste mindestens 1 mg Fusionsprotein zur Verfügung stehen. Zu diesem Zweck müssten ca. 3,5 l Überstand gewonnen werden, was auf technische Schwierigkeiten stoßen würde. Die hier generierten stabilen S2 Transfektanden sind somit nicht zur Produktion größerer Mengen LPS-Trap geeignet. Sie reichen jedoch aus, um die Funktionalität der LPS-Trap näher zu untersuchen.

LPS-Trap-Fc enthaltende Überstände aus S2 Zellen wurden gegen PBS dialysiert und über Protein A Chromatographie gereinigt. Eluiert wurde mit Glycin/HCl Puffer pH 4. Die Konzentration der LPS-Trap-Fc im Überstand und demnach auch in den Elutionsfraktionen war jedoch zu gering, so dass die Sensitivität der Proteinfärbung nicht ausreichte, um das Fusionsprotein im SDS-Gel zu detektieren (Daten nicht gezeigt).

4.1.3.2 Biologische Aktivität der LPS-Trap

4.1.3.2.1 Immunpräzipitation mit MTS 510

Zunächst sollte die Konformation der LPS-Trap überprüft werden. Nachdem Miyake *et al.* (Akashi *et al*, 2000) einen monoklonalen Antikörper generiert (MTS 510) hatten, welcher spezifisch den TLR4/MD-2 Komplex erkennt, sollte überprüft werden, ob dieser Antikörper das Fusionsprotein LPS-Trap detektiert. Gereinigte LPS-Trap aus S2 Zellen wurde mit MTS 510 immunpräzipitiert. Dazu wurde MTS 510 (ca. 1 μg) mit Protein G Sepharose vorinkubiert und nach 1 h wurde gereinigte LPS-Trap zugegeben. Nach Immunpräzipitation (1 h) wurden die Präzipitate im SDS-Gel aufgetrennt und die LPS-Trap konnte im Anti-Flag Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 4.24). Als Negativkontrolle wurde PBS mit MTS 510 immunpräzipitiert (Mock). Somit entspricht die LPS-Trap bezüglich des Epitops, welches der Antikörper MTS 510 erkennt, der Konformation des natürlich vorkommenden TLR4/MD-2 Komplexes.

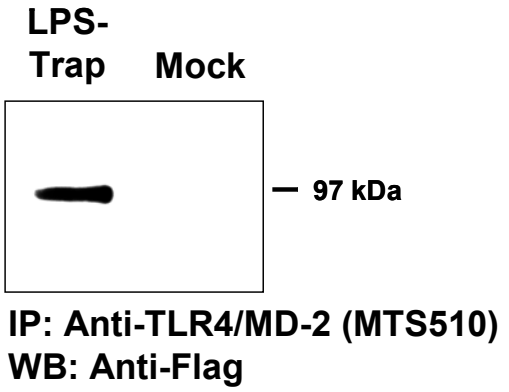


Abb. 4.24: Immunpräzipitation der LPS-Trap mit MTS 510. MTS 510 (1 μg) wurde mit Protein G Sepharose vorinkubiert, bevor die gereinigte LPS-Trap (1 μg) zugegeben wurde. Das Präzipitat wurde anschließend im Western Blot mit einem Anti-Flag Antikörper untersucht. MTS 510 Immunpräzipitation mit PBS diente als Negativkontrolle (Mock).

4.1.3.2.2 Die LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc bindet LPS

Mit Hilfe des „LPS Pull-down assays" sollte nun überprüft werden, ob die LPS-Trap LPS binden kann. Gereinigte LPS-Trap (ca. 1 μg) wurde mit biotinyliertem LPS (ca. 1 μg), CD14 (ca. 1 μg), FCS und rekombinantem LBP (ca. 1 μg) inkubiert. Anschließend wurde mit Strepatividin Sepharose immunpräzipitiert. Im Anti-Flag Western Blot konnte die LPS-Trap bei ca. 100 kDa detektiert werden (Abb. 4.25, Spur 2). Wurde der „LPS Pull-down assay" in Abwesenheit der LPS-Trap durchgeführt, war keine Bande zu detektieren (Abb. 4.25, Spur 3).

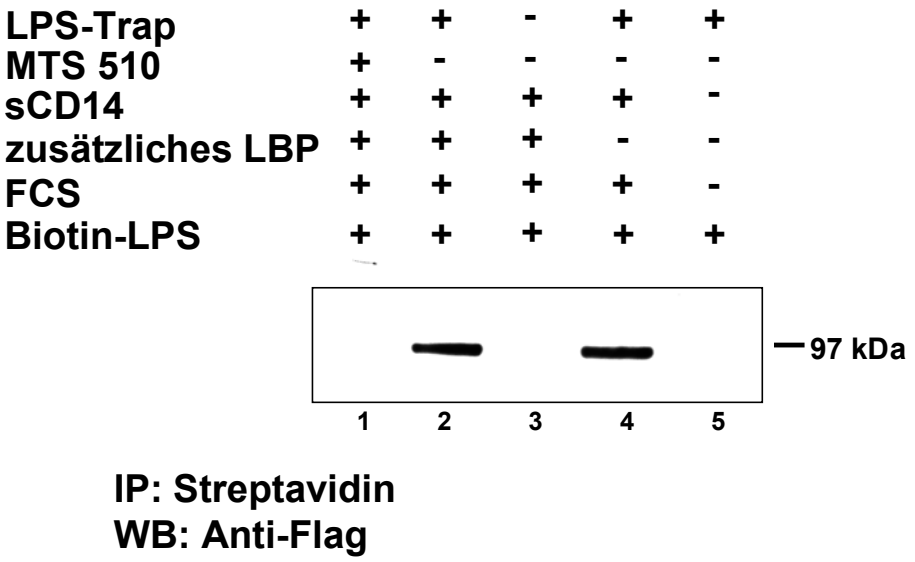


Abb. 4.25: Nachweis der Bindung der LPS-Trap an LPS. Gereinigte LPS-Trap (1 μg; ausgenommen Spur 3, welche als Negativkontrolle diente) wurde mit den angegebenen Serumproteinen (Spur 1, 2, 3, 4), MTS 510 (Spur 1) und biotinyliertem LPS (Biotin-LPS) inkubiert. Anschließend wurde mit Streptavidin Sepharose über Nacht immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden im SDS-Gel aufgetrennt und mittels Anti-Flag Western Blot analysiert.

Jedoch war kein zusätzliches rekombinantes LBP für die Bindung der LPS-Trap an LPS nötig, da die Konzentration von LBP im Serum ausreichend war (Abb. 4.25, Spur 4). Ohne Serumproteine fand erwartungsgemäß keine Bindung der LPS-Trap an LPS statt (Abb. 4.25, Spur 5). Nun war es von großer Bedeutung nachzuweisen, dass die gesamte LPS-Trap an LPS bindet und nicht nur MD-2 (aus der LPS-Trap). Eine alleinige Interaktion zwischen MD-2 und LPS wäre nicht wünschenswert, da MD-2 alleine einen synergistischen Effekt auf die LPS induzierte Zytokinproduktion hat (A. Visintin, Boston, persönliche Mitteilung). Für dieses Experiment wurde wiederum der monoklonale Antikörper MTS 510 benutzt, der auch neutralisierende Eigenschaften aufweist. Nach 1 h Vorinkubation der LPS-Trap mit MTS 510 und anschließendem „LPS Pull-down assay“ konnte die LPS-Trap im Anti-Flag Western Blot nicht detektiert werden (Abb. 4.25, Spur 1). Demnach bindet das gesamte Molekül LPS-Trap LPS und kann mit MTS 510 neutralisiert werden.

Der „LPS Pull-down assay“ wurde auch für die LPS-Trap-Fc durchgeführt. Auch hier konnte gezeigt werde, dass das gesamte Molekül LPS-Trap-Fc an LPS bindet (Daten nicht gezeigt).

4.1.3.2.3 Nur monomere LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc bindet LPS

MD-2 bildet über Disulfidbrücken leicht Oligomere ((Mullen *et al*, 2003) und unter 4.1.2.4.3 bereits gezeigt). Da MD-2 auch ein Bestandteil der LPS-Trap bzw. der LPS-Trap-Fc ist, sollte der Zustand der beiden LPS-Traps unter nicht-reduzierenden Bedingungen untersucht

werden. Dazu wurden Überstände von LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc produzierenden S2 Zellen, sowie von LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc produzierenden HEK 293 Zellen mit Anti-Flag Agarose immunpräzipitiert und im Anti-Flag Western Blot unter nicht-reduzierenden Bedingungen (ohne DTT) und reduzierenden Bedingungen (mit DTT) analysiert. Exemplarisch sind hier die Analysen der Überstände aus HEK 293 dargestellt (Abb. 4.26), Überstände aus S2 Zellen zeigten ein nahezu identisches Bandenmuster.

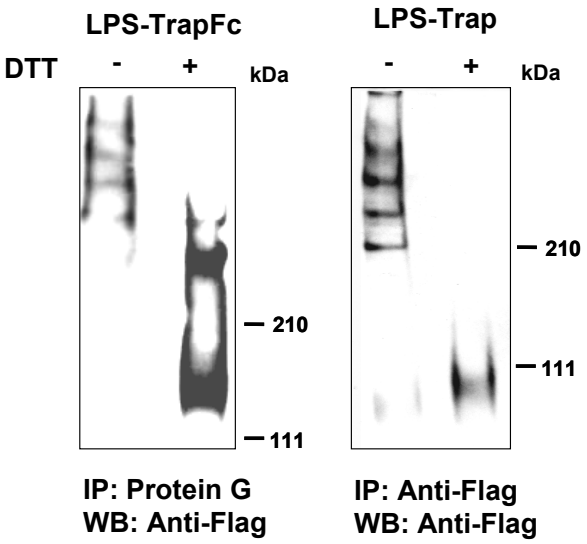


Abb. 4.26: Western Blot Analysen der LPS-Trap und LPS-Trap-Fc unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. Überstände von LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc transfizierten HEK 293 Zellen wurden mit Protein G bzw. mit Anti-Flag Agarose immunpräzipitiert und anschließend im Western Blot unter reduzierenden (+ DTT) und nicht-reduzierenden Bedingungen (- DTT) untersucht. Die Fusionsproteine wurden mit einem Anti-Flag Antikörper detektiert.

Aus den Western Blot Analysen geht deutlich hervor, dass sowohl die LPS-Trap als auch die LPS-Trap-Fc unter nicht-reduzierenden Bedingungen als heterogenes Oligomerengemisch vorliegt und kaum als monomeres Fusionsprotein. Bei Zusatz von DTT erhält man erwartungsgemäß die monomere Form der LPS-Trap bei ca. 110 kDa und der LPS-Trap-Fc bei 160 kDa. Die LPS-Trap-Fc zeigt auch bei Zusatz von DTT noch eine deutliche Bande des Dimers bei ca. 300 kDa. Wahrscheinlich wurde zu wenig DTT eingesetzt, so dass nicht alle Disulfidbrücken gespalten werden konnten.

Da beide LPS-Traps unterschiedliche Formen aufweisen, sollten die nun folgenden Experimente definieren, in welcher Form die beiden Fusionsproteine LPS binden. Um dies zu ermitteln, wurde der „LPS Pull-down assay“ mit anschließendem Western Blot unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

Überstände von transfizierten HEK 293 Zellen wurden mit biotinyliertem LPS (1 μg) inkubiert (FCS war in den Überständen bereits vorhanden) und mit Streptavidin Sepharose immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden dann im Anti-Flag Western Blot untersucht. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen war nur monomere LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc zu

detektieren (Abb. 4.27, jeweils linke Spur). Die rechte Spur zeigt jeweils Überstände von LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc transfizierten HEK 293 Zellen nach Immunpräzipitation mit Anti-Flag Agarose und unter nicht-reduzierenden Bedingungen im Anti-Flag Western Blot. Diese Spur demonstriert jeweils die LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc, welche für den „LPS Pull-down assay“ eingesetzt wurde.

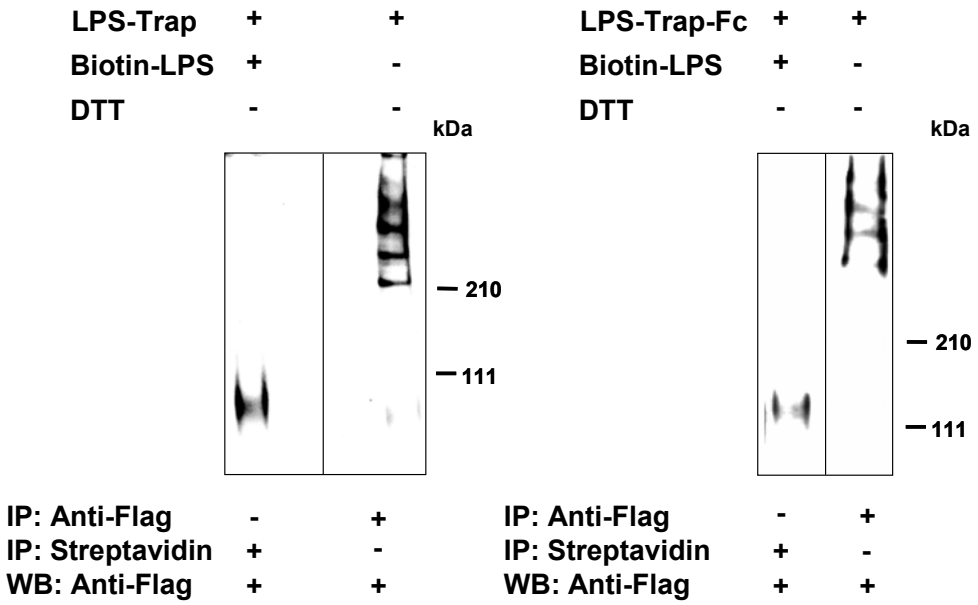


Abb. 4.27: LPS-bindende Form der LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc. Überstände von LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc transfizierten HEK 293 wurden mit Anti-Flag Agarose immunpräzipitiert und im Anti-Flag Western Blot unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert (jeweils rechte Spur). Gleichzeitig hergestellte Überstände von LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc transfizierten HEK 293 wurden mit biotinyliertem LPS inkubiert und mit Streptavidin Sepharose immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden im Anti-Flag Western Blot unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert.

Diese Untersuchungen machen deutlich, dass nur die monomere Form der LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc LPS binden kann. Die Herstellungsmethode in den HEK 293 Zellen und S2 Zellen liefert allerdings ein Oligomerengemisch, das nur zu einem sehr geringen Teil aus der aktiven monomeren Komponente besteht.

4.1.3.3 Herstellung einer mutierten LPS-Trap

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass MD-2 durch Bildung von Polymeren Probleme bereitet. Es ist allerdings bekannt, dass durch die Mutation von 5 Cysteinen in MD-2 die Multimerisierung verhindert werden kann (Mullen *et al*, 2003). Diese Mutationen in MD-2 sollten nun durchgeführt werden, um das ursprüngliche WT MD-2 in den Fusionsproteinen LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc durch mutiertes MD-2 zu ersetzen. Es war zu erwarten, dass

damit der Anteil der aktiven Komponente im Fusionsprotein LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc erhöht würde, weil keine inaktiven Oligomere entstehen können.

4.1.3.3.1 Klonierung der mutierten LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc

Die LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc mit mutiertem MD-2 wurden jeweils in einen Expressionsvektor mit CMV-Promotor und einen Expressionvektor mit Metallothioninpromotor kloniert, um eine Expression sowohl in Säugetierzellen als auch in Insektenzellen zu ermöglichen.

Ein Expressionsvektor mit mutiertem MD-2 (5 der 7 Cystein Reste sind zu Serin Resten mutiert) und C-terminalem huIgGFc, wurde freundlicherweise von Wim Buurman, Maastricht, zur Verfügung gestellt. Dieser Expressionsvektor diente als Vorlage für die PCR, bei der die gesamte mutierte MD-2 cDNA amplifiziert wurde. An den beiden 5`-Enden der verwendeten Primer wurde jeweils eine Restriktionsschnittstelle hinzugefügt (*Xho I* und *Age I*). Mit diesen Restriktionsenzymen wurde das WT MD-2 aus dem LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc enthaltenen Expressionsvektor pMT/BiP/V5-His C ausgeschnitten und mit dem amplifizierten mutierten MD-2 PCR Produkt ersetzt.

Für die Expression in Säugerzellen wurde die cDNA der gesamten LPS-Trap (mit mutiertem MD-2) über die Restriktionsschnittstellen *Not I* und *BamH I* in den Expressionsvektor p3xFlag-CMV-9 kloniert. Analog dazu wurde die cDNA der gesamten LPS-Trap-Fc (mit mutiertem MD-2) mit den Restriktionsenzymen *Not I* und *Sal I* verdaut und in den Expressionsvektor p3xFlag-CMV-8 kloniert.

4.1.3.3.2 Expression der mutierten LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc

LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc mit mutiertem MD-2, im Folgenden als LPS-Trap (mut.) bzw. LPS-Trap-Fc (mut.) bezeichnet, wurde sowohl in HEK 293 Zellen als auch in S2 Zellen exprimiert. Analog zu 4.1.1.2. wurden stabile S2 Transfektanden gewonnen, deren Überstände nach 4 Wochen Selektion im Western Blot auf erfolgreiche Expression untersucht wurden. HEK 293 Zellen wurden mit den beiden Konstrukten transient transfiziert, die Expression beider Fusionsproteine wurde mittels Western Blot analysiert.

Abb. 4.28 zeigt die Analyse der Überstände stabil transfizierter S2 Zellen bzw. transient transfizierter HEK 293 Zellen nach Immunpräzipitation mit Anti-Flag. Die Fusionsproteine wurden mit einem Anti-Flag Antikörper detektiert.

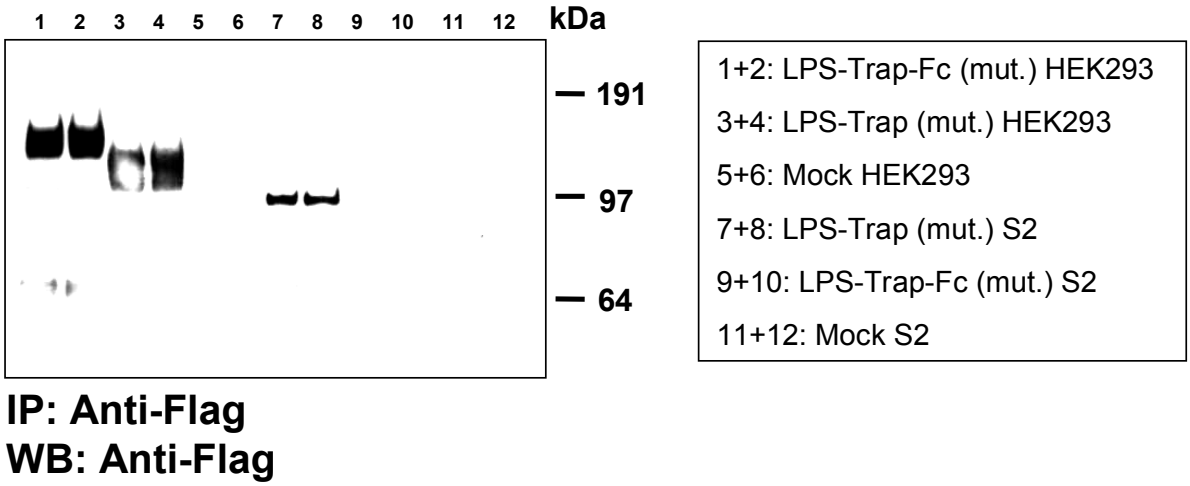


Abb. 4.28: Expression von LPS-Trap-Fc (mut.) bzw. LPS-Trap (mut.) in HEK 293 und S2 Zellen. Überstände von LPS-Trap-Fc (mut.) bzw. LPS-Trap (mut.) transient transfizierter HEK 293 Zellen (Spur 1+2 und 3+4) bzw. von LPS-Trap (mut.) bzw. LPS-Trap-Fc (mut.) stabil transfizierter S2 Zellen (Spur 7+8 und 9+10) wurden mit Anti-Flag Agarose immunpräzipitiert und anschließend im Western Blot über das Flag-Markerpeptid mit einem Anti-Flag Antikörper detektiert. Mit Kontrollvektor transfizierte HEK 293 Zellen bzw. S2 Zellen dienten als Negativkontrolle (Mock) (Spur 5+6 und 11+12). Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die LPS-Trap (mut.) und die LPS-Trap-Fc (mut.) ließen sich in HEK 293 Zellen gut exprimieren, die Expression der LPS-Trap (mut.) in S2 Zellen hingegen war schwach, LPS-Trap-Fc (mut.) wurde nicht exprimiert.

4.1.3.3.3 Biologische Aktivität der mutierten LPS-Trap

Nun war es von großem Interesse zu untersuchen, in welchen Formen die mutierte LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc vorliegt. Überstände von LPS-Trap (mut.) bzw. LPS-Trap-Fc (mut.) transfizierten HEK 293 Zellen wurden mit Anti-Flag Agarose immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden im Anti-Flag Western Blot analysiert (Abb. 4.29).

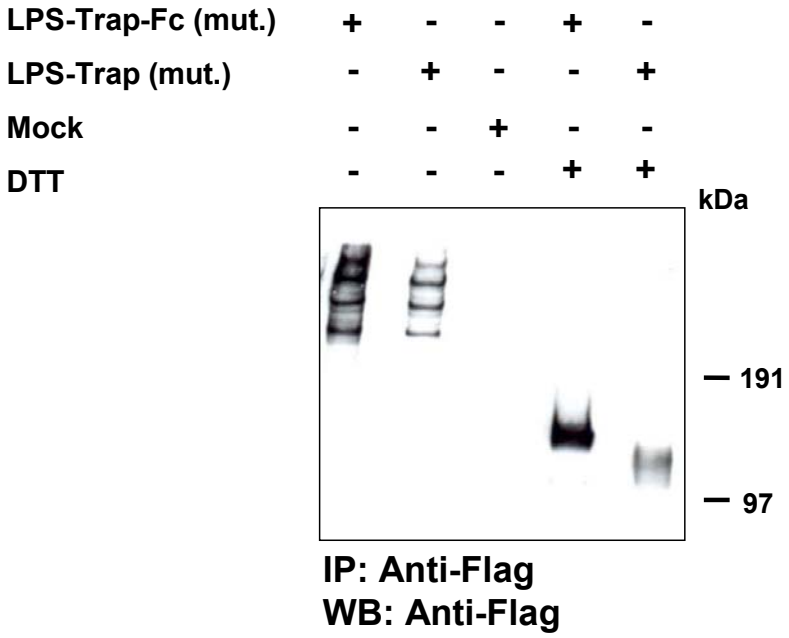


Abb. 4.29: Western Blot Analysen der LPS-Trap (mut.) und LPS-Trap-Fc (mut.) unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. HEK 293 Zellen wurden mit LPS-Trap (mut.) bzw. LPS-Trap-Fc (mut.) transient transfiziert. Die Überstände wurden mit Anti-Flag Agarose immunpräzipitiert und anschließend im SDS-Gel aufgetrennt. Im Western Blot wurden die Präzipitate unter nicht-reduzierenden (- DTT) bzw. reduzierenden Bedingungen (+ DTT) über das Flag-Epitop detektiert. Mit Kontrollvektor transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle (Mock).

Überraschenderweise unterschied sich das Bandenmuster von dem der nicht mutierten LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc kaum. Trotz mutiertem MD-2 lag die LPS-Trap (mut.) bzw. die LPS-Trap-Fc (mut.) unter nicht-reduzierenden Bedingungen ausschließlich als heterogenes Oligomerengemisch vor. Western Blot Analysen unter reduzierenden Bedingungen zeigten erwartungsgemäß die monomere Form des jeweiligen Fusionsproteins. Die Analysen von Überständen transfizierter S2 Zellen brachten gleiche Resultate (Daten nicht gezeigt). Mutiertes MD-2 hatte demnach nicht den erwünschten Effekt gebracht. Um nun auszuschließen, dass mutiertes MD-2 selbst ein heterogenes Oligomerengemisch bildet (im Widerspruch zu den publizierten Daten von Mullen *et al.* (Mullen *et al*, 2003)), sollte zunächst mutiertes MD-2 alleine exprimiert werden.

Zu diesem Zweck wurden HEK 293 Zellen mit dem Expressionsplasmid mMD-2 (mut.)-huIgGFc in pcDNA 3.1, welches mutiertes MD-2 mit einem C-terminalen huIgGFc-Teil enthält, transient transfiziert. Die Expression des Fusionsproteins wurde nach Immunpräzipitation mit Protein G Sepharose der Überstände im Western Blot überprüft, welcher mit einem Anti-huIgG Antikörper gefärbt wurde.

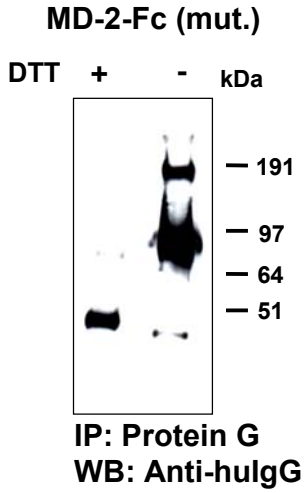


Abb. 4.30: Western Blot Analysen von MD-2-Fc (mut.) unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. Überstände von MD-2-Fc (mut.) transient transfizierter HEK 293 Zellen wurden mit Protein G Sepharose immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden im Western Blot unter reduzierenden (+ DTT) bzw. nicht-reduzierenden (- DTT) Bedingungen untersucht. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-huIgG Antikörper.

Unter nicht-reduzierenden Bedingungen bildet mutiertes MD-2 erwartungsgemäß kaum Oligomere (Abb. 4.30). Der Fc-Teil führt zur Dimerisierung des Fusionsproteins (Bande bei ca. 100 kDa), welcher den Großteil des Proteins ausmacht. Mutiertes MD-2 liegt also nicht als heterogenes Oligomerengemisch vor. Die starke Oligomerisierung der LPS-Trap (mut.) bzw. LPS-Trap-Fc (mut.) hätte durch mutiertes MD-2 also verhindert werden müssen. Es wurde nun in Betracht gezogen, dass es sich bei dem Oligomerengemisch um ein Aufarbeitungsartefakt handeln könnte. Deshalb sollte nun im Folgenden alternative Reinigungsverfahren verwendet werden, wie z.B. mittels einer Affinitätssäule (4.1.3.3.5).

4.1.3.3.4 Mutierte LPS-Trap bindet kein LPS

Zuvor sollte noch mit Hilfe des „LPS Pull-down assays“ die Frage geklärt werden, ob LPS-Trap (mut.) bzw. LPS-Trap-Fc (mut.) überhaupt LPS binden kann. Überstände transfizierter HEK 293 Zellen wurden mit biotinyliertem LPS (1 μg) in der Anwesenheit von 10% FCS im Medium inkubiert und mit Streptavidin Sepharose immunpräzipitiert. Anti-Flag Western Blot Analysen unter reduzierenden Bedingungen zeigten, dass die mutierten LPS-Traps nicht mehr die Fähigkeit besaßen, LPS zu binden, wohingegen LPS-Traps mit WT MD-2 LPS binden konnten. Dies fungierte als Positivkontrolle für den „LPS Pull-down assay“ (Abb. 4.31).

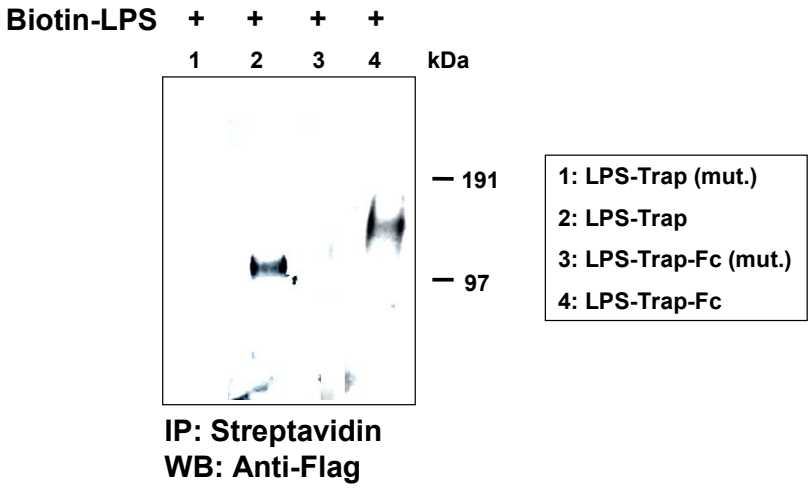


Abb. 4.31: Untersuchung der LPS-Bindung von LPS-Trap (mut.), LPS-Trap-Fc (mut.), LPS-Trap und LPS-Trap-Fc. Überstände von LPS-Trap (mut.) (Spur 1), LPS-Trap (Spur 2), LPS-Trap-Fc (mut.) (Spur 3) und LPS-Trap-Fc (Spur 4) transfizierter HEK 293 Zellen wurden mit biotinyliertem LPS (ca. 1 μg) inkubiert. Nach 1 h Inkubation wurde mit Streptavidin Sepharose über Nacht immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden im SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine im Western Blot über das Flag-Epitop detektiert.

4.1.3.3.5 Generierung monomerer LPS-Trap

Die Überstände von LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc transfizierten HEK 293 Zellen sollten nun über Affinitätschromatographie gereinigt werden, um die Ausbeute an monomeren Fusiosnproteinen zu erhöhen. Für die LPS-Trap wurde eine Nickelchelat-Säule verwendet. Diese wurde mit Überstand beladen, gewaschen und mit 10 mM Imidazol eluiert. Überstände mit LPS-Trap-Fc wurden analog zu 4.1.1.5.3 über Protein A Affinitätschromatographie gereinigt. Die Elution erfolgte mit Glycin/HCl Puffer, pH 4. Im Anti-Flag Western Blot wurden die einzelnen Elutionen überprüft, und jene mit dem höchsten Gehalt an LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc für die weiteren Versuche verwendet (Daten nicht gezeigt). Zunächst sollten die Elutionsfraktionen mit LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc unter nicht-reduzierenden und unter reduzierenden Bedingungen untersucht werden.

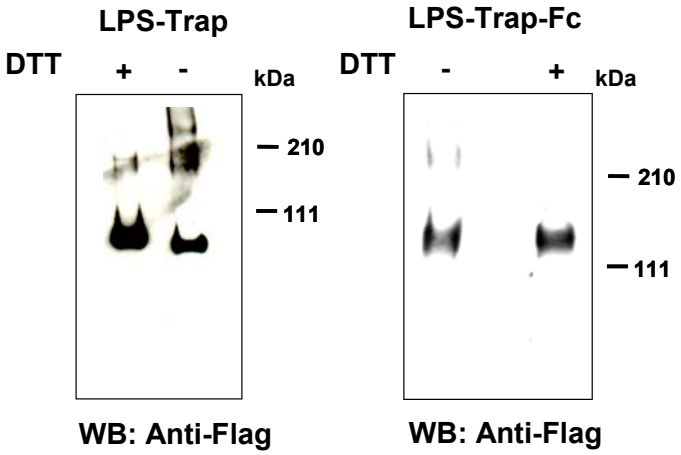


Abb. 4.32: Western Blot Analysen der LPS-Trap und LPS-Trap-Fc unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. Gereinigte LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc wurde im SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot unter reduzierenden (+ DTT) bzw. unter nicht-reduzierenden (- DTT) Bedingungen mit einem Anti-Flag Antikörper detektiert.

Anti-Flag Western Blot Analysen zeigten, dass nach Affinitätschromatographie deutlich weniger LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc –Oligomere gewonnen wurden als nach Immunpräzipitationsexperimenten (Abb. 4.32). Die Hauptkomponente der Fusionsproteine ist das Monomer. Somit könnte es sich bei dem vorher beschriebenen Problem der Oligomerenbildung tatsächlich um einen Aufarbeitungsartefakt handeln.

4.1.3.4 Inhibitorische Aktivität der LPS-Trap

Wie bereits mehrfach gezeigt wurde, hat das Fusionsprotein LPS-Trap die Fähigkeit LPS zu binden. Um herauszufinden, ob die LPS-Trap auch LPS Aktivität neutralisieren kann, wurde die Auswirkung der LPS-Trap auf die proinflammatorische Reaktion *in vitro* untersucht. Für dieses Experiment wurde ein Transwell-System benutzt, um die LPS-Trap möglichst nativ einzusetzen.

HEK 293T Zellen wurden mit LPS-Trap (Trap) Konstrukt oder Kontrollvektor (Mock) transfiziert und in eine 24-well Platte ausgesät. Nach Einsetzen von RAW 264.7 gefüllten Transwells wurden diese mit 100 ng/ml bzw. 1 μg/ml gereinigtem LPS 12 h stimuliert. TNF wurde dann in den Überständen mittels ELISA bestimmt. LPS stimulierte die TNF Sekretion in RAW 264.7 (Abb. 4.33). RAW 264.7, welche mit LPS-Trap transfizierten HEK 293T Zellen inkubiert waren, zeigten eine signifikant ($p=0,028$) geringere TNF Produktion im Gegensatz zu RAW 264.7, welche mit Mock transfizierten HEK 293T Zellen kokultiviert wurden. Dieser Effekt zeigte sich sowohl bei einer LPS Konzentration von 100 ng/ml (Abb. 4.33A), als auch bei einer LPS Konzentration von 1 μg/ml (Abb. 4.33B). Die LPS-Trap hemmt demnach LPS induzierte proinflammatorische Reaktionen *in vitro*.

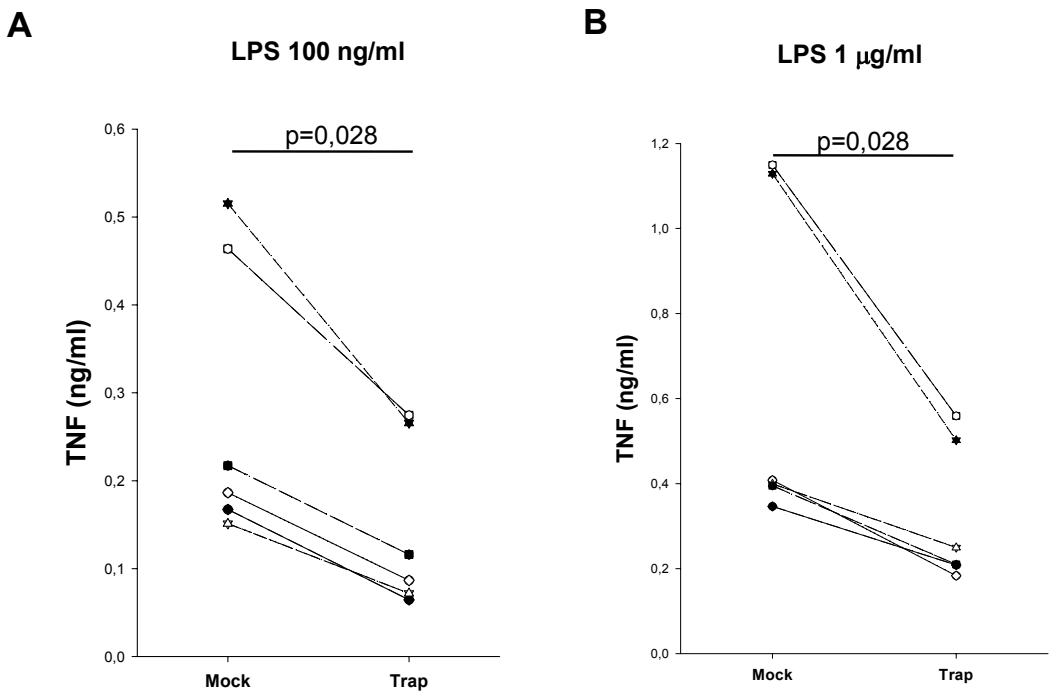


Abb. 4.33: Messung der biologischen Aktivität der LPS-Trap. HEK 293T Zellen, transfiziert mit LPS-Trap (Trap) oder mit Kontrollvektor (Mock), wurden in eine 24-well Platte ausgesät. Nach 12 h wurde ein mit RAW 264.7 beladenes Transwell eingesetzt und wiederum 8 h inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 100 ng/ml **(A)** oder 1 µg/ml gereinigtem LPS **(B)** 12 h stimuliert. Anschließend wurde TNF im Überstand mittels ELISA gemessen. Sechs unabhängige Proben wurden analysiert (p=0,028 nach dem Wilcoxon signed rank test).

4.1.3.5 Produktion der LPS-Trap in verschiedenen Expressionssystemen

Nachdem die inhibitorische Wirkung der LPS-Trap *in vitro* nachgewiesen wurde, sollte nun eine ausreichende Menge an LPS-Trap hergestellt werden, um *in vivo*-Experimente durchführen zu können. Die Expression in S2 Zellen und HEK 293 Zellen war für funktionelle Experimente sowie für *in vitro* Untersuchungen ausreichend, jedoch nicht geeignet, um sinnvolle Mengen für *in vivo* Experimente zu generieren. Um das optimale Expressionssystem zu evaluieren, wurden verschiedene Zelllinien mit LPS-Trap bzw. LPS-Trap-Fc transfiziert und die Expression im Western Blot überprüft.

4.1.3.5.1 Expression in Säugerzellen

Außer HEK 293 Zellen werden häufig die Säugerzelllinien CHO und COS-7 für die Produktion rekombinanter Proteine benutzt. Deshalb sollte untersucht werden, ob die Expression der LPS-Trap in diesen Zelllinien eine größere Menge LPS-Trap liefert. CHO- und COS-7-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid LPS-Trap in p3xFlag-CMV-8 transient transfiziert. Nach 24 h wurden Überstände beider Zelllinien bezüglich der

Expression der LPS-Trap getestet. Dazu wurden die Überstände mit Anti-Flag Agarose immunpräzipitiert und die resultierenden Präzipitate im Anti-Flag Western Blot analysiert. Außerdem wurden die Überstände direkt im Anti-Flag Western Blot untersucht. Falls die Menge an rekombinantem Fusionsprotein aus CHO- bzw. COS-7-Zellen die der S2- bzw. HEK 293-Zellen deutlich übersteigt, sollte die LPS-Trap im Überstand problemlos im Western Blot detektiert werden. Die LPS-Trap konnte in beiden Expressionssystemen gut exprimiert werden. Im Überstand von CHO Zellen war das Fusionsprotein auch direkt im Überstand zu detektieren (Abb. 4.34).

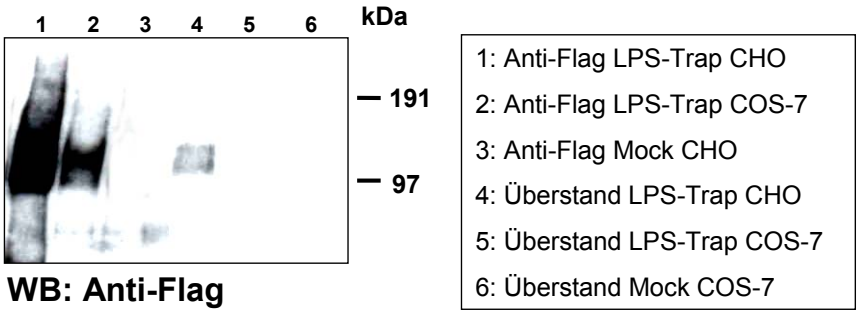


Abb. 4.34: Expression der LPS-Trap und LPS-Trap-Fc in CHO- und COS-7 Zellen. CHO- bzw. COS-7 Zellen wurden mit LPS-Trap transient transfiziert. Die Überstände wurden dann entweder nach Immunpräzipitation mit Anti-Flag Agarose (Spur 1, 2, 3) oder direkt mittels Western Blot (Spur 4, 5, 6) untersucht. Die LPS-Trap wurde über das Flag-Epitop mit einem Anti-Flag Antikörper nachgewiesen. Mit Kontrollvektor transfizierte CHO- bzw. COS-7 Zellen dienten als Negativkontrolle.

Zunächst wurden große Mengen Überstand (300 ml) von LPS-Trap transfizierten CHO Zellen gewonnen, diese über eine Nickelchelat-Säule gereinigt und die resultierenden Elutionsfraktionen auf Proteinmenge und –reinheit untersucht. Die quantitative Analyse der einzelnen sehr reinen Fraktionen ließ eine Proteinkonzentration von 400 ng/ml Überstand transfizierter Zellen errechnen. Dies entspricht ungefähr der Proteinmenge aus HEK 293 Zellen, was letztendlich also keine deutlich erhöhte Menge an rekombinantem Protein erbrachte.

4.1.3.5.2 Expression im Baculovirus-System

Das Baculovirus-Expressionssystem ist ein virales Expressionssystem, welches hohe Transfektionsraten und hohe Proteinausbeuten liefert. Im Folgenden sollte die Expression der LPS-Trap auch in diesem Expressionssystem getestet werden. Üblicherweise verwendet man das *Autographa california Nuclear Polyhedrosis Virus* (AcNPV) als Baculovirus und transfiziert damit SF-9 oder SF-21 Insektenzellen. Beide Zelllinien stammen von *Spodoptera frugiperda* ab (Vaughn *et al*, 1977).

Zur Herstellung des rekombinanten Baculovirus wurde das Bac-To-Bac® Baculovirus Expressionssystem von Invitrogen verwendet. Zunächst wurde die gesamte LPS-Trap cDNA einschließlich der BiP Signalsequenz aus dem Expressionsvektor LPS-Trap in pMT/BiP/V5-His C über die Restriktionsschnittstellen *BamH I* und *Sal I* ausgeschnitten und in den Transfervektor pFASTBAC1 kloniert. Dieser Vektor verfügt über einen Polyhedrin-Promotor, der zur Expression von Transgene geeignet ist. Der Vektor wurde dann in Bakterien des Stammes *DH10bac* transformiert. Dieser Stamm enthält die virale DNA (Bacmid) und ein Helfer-Plasmid, auf dem die Sequenz für eine Transposase liegt. In den Bakterien findet nun eine homologe Rekombination zwischen dem Transfervektor und der Bacmid-DNA statt. Anschließend kann die rekombinante Bacmid-DNA isoliert werden, mit der die Insektenzellen SF-21 transfiziert wurden. Eine erfolgreiche Transfektion wurde anhand der Morphologie der Insektenzellen erkannt, denn die Zellen änderten diese nach der Transfektion, da sie Viren produzierten und der Zellkern daher an den Rand der Zelle gedrückt wurde. Das Zytoplasma erschien gekörnt (Daten nicht gezeigt).

Um die Expression der LPS-Trap nach Transfektion der Bacmid-DNA zu überprüfen, wurden mit den Überständen der SF-21 Zellen Western Blot Analysen durchgeführt. Die Überstände wurden im SDS-Gel aufgetrennt und im Anti-Flag Western Blot untersucht. Das rekombinante Fusionsprotein LPS-Trap konnte mit dem Anti-Flag Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 4.35).

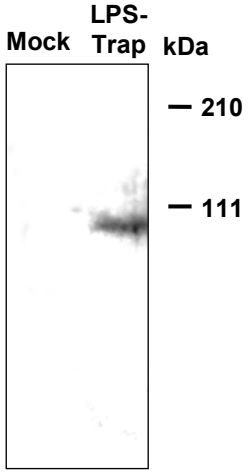


Abb. 4.35: Expression der LPS-Trap in SF-21 Zellen. SF-21 Zellen wurden mit rekombinanter Bacmid-DNA transfiziert. Überstände der SF-21 Zellen wurden nach 7 Tagen auf Expression der LPS-Trap im Western Blot untersucht. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-Flag Antikörper. Mit Kontroll-Bacmid transfizierte SF-21 Zellen dienten als Negativkontrolle (Mock).

Aufgrund dieser Resultate wurde angenommen, dass die SF-21-Zellen die LPS-Trap exprimierten und demzufolge auch rekombinante Viren produzieren. Die Überstände der SF-21 Zellen werden gegenwärtig zur Amplifikation der Viren und zur Herstellung eines hochtitrigen Virus-Stocks benutzt.

4.1.3.5.3 Expression in S2 Zellen

Um eine genügend große Menge rekombinanter LPS-Trap zu gewinnen, wurden außerdem neue stabile S2 Zellpopulationen generiert. Dabei wurden S2 Zellen stabil mit LPS-Trap transfiziert, und anschließend 4 Wochen mit Hygromycinhaltigem Medium selektioniert (siehe 3.3.5.2.1). Zur Transfektion wurden, im Unterschied zu den stabilen LPS-Trap exprimierenden S2 Zellpopulationen aus 4.1.3.1.3, andere DNA Verhältnisse (LPS-Trap zu pCoHygro) verwendet. Werden geringere Anteile des Hygromycin-Vektors eingesetzt, kann man davon ausgehen, dass die Hygromycin-resistenten Zellpopulationen mit hoher Wahrscheinlichkeit das Fusionsprotein exprimieren. Zunächst wurde im Anti-Flag Western Blot die Expression des Fusionsproteins überprüft und anschließend wurden 100 ml Kulturüberstand über chelatbindende Sepharose gereinigt (analog zu 4.1.2.4.2). Die Elutionsfraktionen wurden dann mittels Gelelektrophorese analysiert (Abb. 4.36).

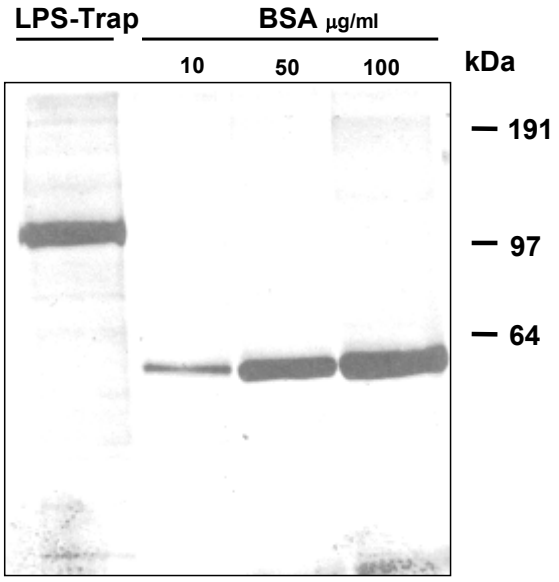


Abb. 4.36: Expression der LPS-Trap in S2 Zellen. LPS-Trap enthaltendes Kulturmedium wurde über chelatbindende Sepharose gereinigt. Nach der Elution mit 10 mM Imidazol wurden die einzelnen Fraktionen im SDS-PAGE analysiert. Das Proteingel wurde mit Syprored Protein stain gefärbt.

Mittels quantitativer Proteinbestimmung konnte ein Gehalt von ca. 100µg/ml LPS-Trap in den einzelnen Elutionsfraktionen gemessen werden. Die neue Herstellungsmethode in S2 Zellen erbrachte also ein Protein von großer Reinheit und ausreichender Menge.

4.1.3.6 Test der LPS-Trap *in vivo*

Mit dem rekombinanten Fusionsprotein aus den S2 Zellen sollte nun ein erstes *in vivo* Experiment durchgeführt werden. In einem kleinen Pilotexperiment wurden 4 NMRI-Mäuse

mit LPS-Trap (50 μg/ml) und 1 μg LPS i.p. behandelt und nach 90 min geblutet. 4 Mäuse dienten als Positiv-Kontrolle. Diesen wurden nur LPS (1μg) i.p. injiziert. 2 Mäuse wurden unbehandelt gelassen, geblutet und dienten als Negativ-Kontrolle.
Anschließend wurde Serum gewonnen und TNF mittels ELISA bestimmt (Abb. 4.37). Die Mäuse, welche die LPS-Trap erhielten, zeigten deutlich geringere TNF Spiegel als die Mäuse, welche nur mit PBS behandelt wurden. Da dieser erste Pilotversuch viel versprechend verlief, wird momentan ein Versuch mit einer größeren Zahl an Mäusen durchgeführt.

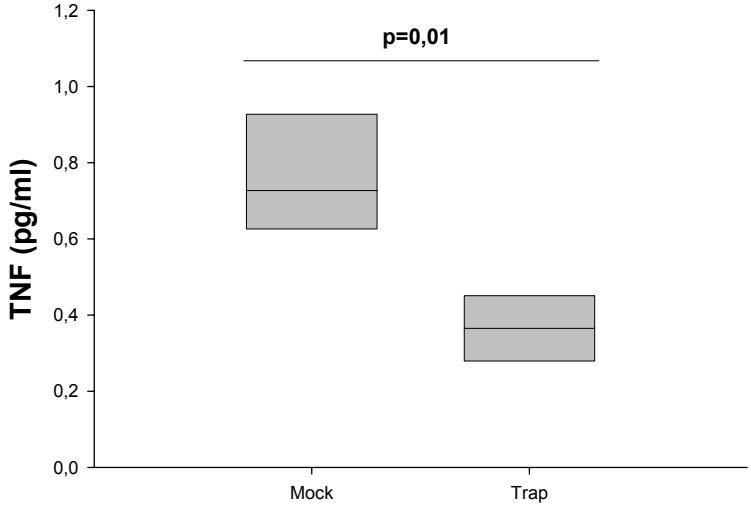


Abb. 4.37: Testung der LPS-Trap *in vivo.* 4 NMRI Mäuse wurden entweder mit LPS-Trap (50 μg pro Maus) und LPS (1 μg pro Maus) oder mit PBS und LPS (1 μg pro Maus) i.p. injiziert. Nach 90 min wurden die Mäuse geblutet und TNF mittels ELISA im Serum gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem T-Test für unabhängige Stichproben (p=0,01).

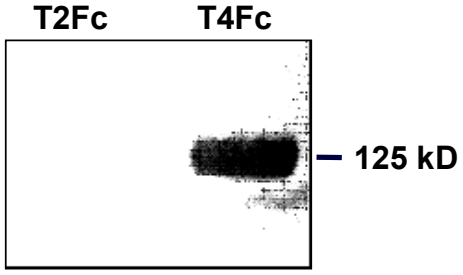
4.2 Herstellung von Antikörpern gegen den extrazellulären Teil von TLR2 bzw. TLR4

Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit Vorarbeiten zu späteren Experimenten, welche die Freisetzung von löslichen TLRs *in vitro* und *in vivo* untersuchen werden.
Unter den Bedingungen der Sepsis und *in vitro* bei Exposition von Gesamtblut-Kulturen gegen mikrobielle Zellwandstrukturen werden möglicherweise intakte TLRs oder TLR-Fragmente von den Zellen abgegeben, z.B. über alternatives Spleißen (Iwami *et al*, 2000). Durch dies könnte – analog zu vielen anderen Rezeptoren – die angeborene Immunantwort moduliert werden. Um TLR Fragmente *in vitro* oder *in vivo* zu detektieren, müsste ein ELISA für lösliches TLR etabliert werden. Dazu wären Antikörper erforderlich, die spezifisch den Extrazellularteil der murinen TLRs erkennen, allerdings bisher kommerziell nicht erhältlich

sind. Deshalb müssen zunächst in umfangreichen Vorarbeiten Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von TLR2 bzw. TLR4 entwickelt werden, um darauf aufbauend einen ELISA für lösliches TLR zu etablieren. Für einen optimalen ELISA müssten jeweils zwei nicht kompetitive Antikörper zur Verfügung stehen. Deshalb wurde versucht, polyklonale und monoklonale Antikörper zu generieren.

4.2.1 Polyklonale Antikörper gegen den extrazellulären Teil von TLR2 bzw. TLR4

Zur Herstellung von polyklonalen Antiseren gegen löslichen Maus TLR2 und TLR4 wurden Kaninchen mit rekombinanten Proteinen immunisiert. Zunächst wurden von rekombinantem T2Fc und T4Fc die sehr immunogenen Fc-Teile mit Hilfe von Faktor Xa Protease abgespalten und durch Protein A Sepharose Chromatographie entfernt (analog 4.1.1.3).
Kaninchen wurden dreimal im Abstand von 2 Wochen mit jeweils löslichem TLR2 bzw. TLR4 immunisiert. Pro Immunisierung wurden ca. 50 μg Protein verwendet. 4 Tage nach den Immunisierungen wurden den Kaninchen am Ohr Blut entnommen, die Serumphase gewonnen und der Antikörper-Titer gegen löslichen TLR2 bzw. TLR4 mittels ELISA bestimmt. Nach zweimaliger Immunisierung konnte ein Antikörper-Titer von 1:50.000 für lösliches TLR4 im Kaninchen Serum nachgewiesen werden. Der Titer verbesserte sich nach der dritten Immunisierung nur unwesentlich. Gegen lösliches TLR2 wurde kein spezifisches Serum gewonnen.
Da die ELISA-Platten mit dem Fusionsprotein beschichtet waren, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass im ELISA Antikörper gegen Flag oder gegen den immunogenen Fc-Teil (falls nicht vollständig entfernt) nachgewiesen wurden. Deshalb wurde das TLR4 Antiserum auch auf T2Fc beschichteten Platten getestet. Das Serum gegen löslichen TLR4 war auf T2Fc beschichteten Platten jedoch nicht spezifisch. Zur weiteren Kontrolle wurden auch Flag- und huIgG-beschichtete Platten verwendet. Diese zeigten ebenfalls keine Reaktion auf das TLR4-spezifische Antiserum (Daten nicht gezeigt).
Die Spezifität sollte nun noch in Western Blot Analysen überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden gleiche Mengen T2Fc bzw. T4Fc (jeweils ca. 500 ng) im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Diese wurde mit dem Anti-Serum, das 1:1000 verdünnt wurde, inkubiert und gebundener Antikörper mit Alkalischer Phosphatase konjugiertem Anti-Kaninchen-Antikörper detektiert. T4Fc konnte im Gegensatz zu T2Fc spezifisch mit dem Anti-TLR4-Serum nachgewiesen werden (Abb. 4.38).



WB: 2.Immunserum anti-sTLR4

Abb. 4.38: Detektion von T4Fc mit Anti-sTLR4-Antiserum. Ca. 500 ng T2Fc bzw. T4Fc wurden im SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Zur Detektion wurde Anti-sTLR4-Antiserum aus Kaninchen (1:1000) benutzt. Die Bindung der Kaninchen Antikörper wurde mit Anti-Kaninchen-Alkalische Phosphatase-Konjugat (1:4000) nachgewiesen.

Zur weiteren Charakterisierung des Antiserums wurden Membranlysate von verschiedenen TLR4 positiven Zelllinien getestet. Membranlysate von TLR4 KO Mäusen dienten als Negativkontrolle. Nach Auftrennung der einzelnen Lysate im SDS-Gel, wurde diese mit dem polyklonalen Antiserum (1:1000) im Western Blot analysiert (Abb. 4.39). Bei allen TLR4 positiven Zelllinien wie NIH, RAW 264.7 und CT26 ließ sich der murine TLR4, mit einem Molekulargewicht von ca. 86 kDa, detektieren. TLR4 defiziente Mäuse zeigten erwartungsgemäß kein Signal.

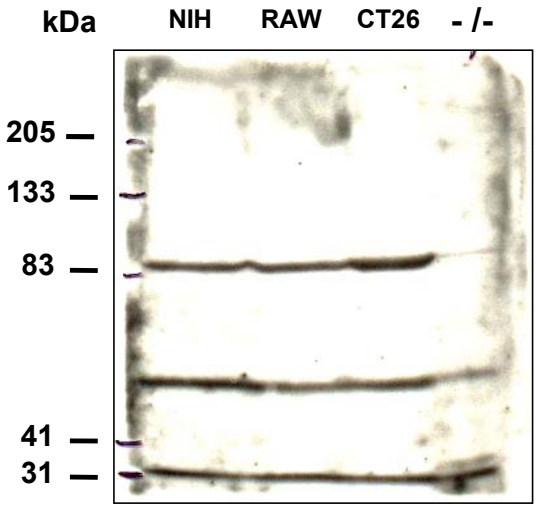


Abb. 4.39: Detektion von TLR4 verschiedener Zelllinien mit Anti-sTLR4-Antiserum. Membranlysate von verschiedenen TLR4 positiven Zelllinien wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western Blot mit dem polyklonalen TLR4 Antiserum analysiert. Als Negativkontrolle wurde ein Membranlysat aus TLR4 defizienten Zellen verwendet.

Der polyklonale Antikörper ist also spezifisch für TLR4 und detektiert sowohl das rekombinante TLR4 Protein als auch TLR4 in bestimmten Zelllinien. Mit Hilfe dieses

Antiserums und eines weiteren monoklonalen Antikörpers gegen die lösliche Domäne von TLR4 sollte es möglich sein, einen ELISA für lösliches TLR4 zu etablieren.

4.2.2 Monoklonale Antikörper gegen den extrazellulären Teil von TLR4

Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen den extrazellulären Teil von TLR4 wurde mit der Immunisierung von TLR4-defizienten Mäusen begonnen, die freundlicherweise von Marina Freudenberg, Freiburg, bereitgestellt wurden. Zur Immunisierung wurde wiederum von rekombinantem T4Fc der sehr immunogene Fc-Teil mittels Faktor Xa Protease Verdauung abgespalten und über Protein A Affinitätschromatographie entfernt (analog 4.1.1.3).

Zwei TLR4-defiziente Mäuse wurden dreimal in Abständen von 3 Wochen immunisiert. 4 Tage nach der 2. Immunisierung wurde Blut entnommen und der Antikörper-Titer mittels ELISA bestimmt. Wegen des geringen Titers von 1:20.000 musste ein drittes Mal immunisiert werden. Die Antigenmenge pro Immunisierung betrug 50 μg Protein. Vier Tage nach der letzten Injektion wurde die Milz von einer Maus entnommen und mit der halben Milz eine Zellsuspension hergestellt. (Die andere Hälfte der Milz wurde in flüssigem Stickstoff gelagert). Diese wurde mit der murinen B-Zell-Myelomlinie SP/2/0 fusioniert. Die entstandenen Hybridomzellen wurden über HAT-Medium selektioniert. Nach ca. 3 Wochen wurden die Überstände der Hybridome auf Antikörper gegen TLR4 getestet. Das Screening auf Antikörper mit der gewünschten Spezifität in den Kulturüberständen der Klone erfolgte durch ELISA. Hierzu wurden ELISA Platten mit T4Fc beschichtet. Nach Inkubation mit den Hybridomüberständen wurden nicht gebundene Antikörper durch Waschen entfernt und die Bindung von Maus-Antikörpern durch Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Kaninchen-anti-Maus Antiserum durch Zugabe des Substrats nachgewiesen. Spezifische Antikörper müssen an das T4Fc Produkt binden. Dies ergibt eine eindeutige Identifizierung. In der ersten Testrunde wurden 9 Kandidatenwells von 1500 definiert, die sich aber alle als nicht stabil erwiesen. Diese Versuche werden momentan mit der anderen Hälfte der Milz fortgesetzt.

4.3 Untersuchung der Dichte von TLR2 und TLR4 auf Monozyten und Granulozyten im peripheren Blut bei Patienten mit Sepsis und gesunden Kontrollen

Mit den folgenden Experimenten sollten physiologische und pathologische Veränderungen der TLR Dichte auf Zellen des peripheren Blutes bei Patienten mit Sepsis und gesunden Probanden beschrieben werden.

Außerdem sollten Veränderungen der TLR Dichte auf Monozyten in Gesamtblutkulturen nach *in vitro* Exposition mit LPS untersucht werden. Diese Experimente sollen der Etablierung eines humanen Modellsystems zur *in vitro* Simulation der bei Patienten mit Sepsis *in vivo* beobachteten Veränderungen dienen. Weiter sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen den Veränderungen der TLR Dichte und dem Schweregrad bzw. der Mortalität der Sepsis existiert. Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe Infektiologie konnten eine erhöhte TLR2- und TLR4- mRNA Konzentration in mononukleären Zellen des peripheren Blutes unter den Bedingungen der Sepsis zeigen. Nun sollte untersucht werden, ob tatsächlich eine erhöhte Antigen-Dichte von TLR2 und TLR4 auf der Zelloberfläche von Monozyten und Granulozyten bei Patienten mit Sepsis vorliegt.

4.3.1 Etablierung eine Protokolls für die Durchflusszytometrie

Zunächst sollte ein Protokoll für die Durchflusszytometrie etabliert werden, um die Dichte von TLR2 und TLR4 auf der Oberfläche von Monozyten und Granulozyten im Vollblut zu quantifizieren und um Variationen der TLR-Dichte unter dem *in vitro* Einfluss von LPS zu bestimmen. Gesamtblut von Patienten mit Sepsis oder von Normalpersonen wurden mit 40 ng/ml LPS (aus *Salmonella minnesota)* bzw. 0,9% NaCl inkubiert und anschließend in PBS gewaschen. Monozyten und Granulozyten wurden mit APC-gekoppelten anti–CD14-Antikörpern markiert und im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht identifiziert. Die Oberflächenverteilung von TLR2 wurde mit einem monoklonalen anti-humanen TLR2 Antikörper (Klon TL2.1) ermittelt, der mit einem sekundären PE-gekoppelten Antikörper gefärbt wurde. Die Oberflächenverteilung von TLR4 wurde mit einem PE-gekoppelten anti-humanen TLR4 Antikörper (Klon HTA 125) untersucht. Mittels Durchflusszytometrie konnte die Dichte von TLR2, TLR4 und CD14 auf der Monozyten- und Granulozytenoberfläche quantifiziert werden.

Bevor ein definiertes Patientenkollektiv untersucht wurde, sollten Titrationsversuche durchgeführt werden, um die optimale Konzentration der Antikörper für den Nachweis der TLRs auf der Monozyten-Oberfläche zu bestimmen (Abb. 4.40). Die so ermittelten Antikörper

Konzentrationen (TL2.1: 5 μg/ml und HTA 125: 20 μg/ml) wurden in den folgenden Experimenten eingesetzt.

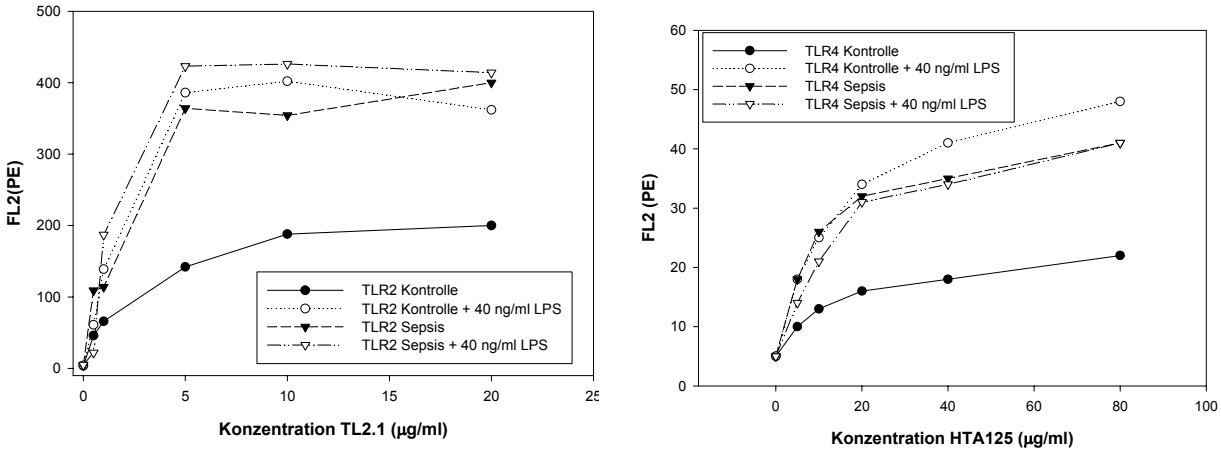


Abb. 4.40: Titrationsversuche mit anti-humanen TLR2 und TLR4 Antikörper. Blut von Normalpersonen (Kontrolle) bzw. von Patienten mit Sepsis (Sepsis) wurde mit 40 ng/ml LPS (aus *Salmonella minnesota*) bzw. mit 0,9% NaCl inkubiert. Die Oberflächedichte von TLR2, TLR4 und CD14 wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Fluoreszenzen FL2 (rot) der PE-gekoppelten TLR-Antikörper und FL4 (orange) des APC-gekoppelten anti–CD14-Antikörper wurden simultan im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht analysiert. Die Bestimmungen wurden mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen von Klon TL2.1 gegen humanes TLR2 und Klon HTA 125 gegen humanes TLR4 durchgeführt, um die optimalen Konzentrationen kurz vor Erreichen der Sättigungsgrenze zu bestimmen.

4.3.2 Patientenkollektiv

23 Patienten von verschiedenen Intensivstationen des Klinikums der Universität Regensburg (Innere Medizin, Chirurgie, Anästhesie), bei denen entsprechend der ACCP/SSCM Konsensus-Definition eine Sepsis diagnostiziert wurde, wurden innerhalb von 48 h nachdem die Sepsiskriterien erfüllt waren, untersucht. 12 gesunde freiwillige Probanden wurden als Kontrollen rekrutiert. Die Patienten wurden entsprechend des Keimnachweises aus den entnommenen Proben in folgende Gruppen unterteilt: Gram-positive (n=4), Gram-negative (n=7), polymikrobielle (n=8) oder Kultur-negative Infektion (n=3). Das mediane Alter der Patienten war 65,5 Jahre (27-85); der mediane *simplified acute physiology score* (SAPS) II betrug 22 (12-44).

4.3.3 Untersuchungen der Dichte von TLR2 auf Monozyten und Granulozyten

Zunächst wurde die basale Expression von TLR2 auf Monozyten und Granulozyten von Patienten mit Sepsis und gesunden Kontrollprobanden untersucht. Weder für die eine noch

für die andere Zellpopulation zeigte sich ein signifikanter Unterschied. Auch nach *in vitro* Stimulation mit 40 ng/ml LPS änderte sich die Dichte von TLR2 auf der Oberfläche von Monozyten und Granulozyten nicht. Demnach ergab sich auch kein Unterschied zwischen dem Stimulationsindex (dem Quotienten aus TLR Oberflächendichte nach LPS Stimulation und TLR Oberflächendichte ohne Stimulation) bei Patienten mit Sepsis und gesunden Kontrollen.
Die TLR2 Expression auf Monozyten und Granulozyten septischer Patienten zeigte also keinen signifikanten Unterschied im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Daten nicht gezeigt).

4.3.4 Untersuchungen der Dichte von TLR4 auf Monozyten und Granulozyten

Auf den Monozyten septischer Patienten zeigte sich bereits vor Stimulation mit LPS eine signifikant erhöhte TLR4 Expression im Vergleich mit der Kontrollgruppe (p=0,001) (Abb. 4.41A). Dieser Unterschied mit der Kontrollgruppe war signifikant für alle Subgruppen der septischen Patienten, allerdings ließ sich in der Subgruppenanalyse innerhalb der Sepsisgruppe kein signifikanter Unterschied für die Basisstimulation feststellen (p=0,1) (Abb. 4.41B). Der Stimulationsindex für TLR4 auf Monozyten war signifikant höher in der Kontrollgruppe verglichen mit allen Subgruppen in der Patientengruppe ($p<0.001$ für alle Patienten, $p<0.05$ für Patienten mit Gram-positiver Sepsis und $p<0.01$ für alle anderen Subgruppen) (Abb. 4.41C). Vorausgesetzt, dass das Kollektiv der septischen Patienten im Rahmen der Bakteriämie einem *in vivo* LPS Stimulus ausgesetzt war, zeigen die Daten eine direkte Korrelation der TLR4 Expression auf Monozyten und LPS Stimulation *in vivo* und *in vitro.*

Auf den Granulozyten hingegen war die TLR4 Expression signifikant höher in der Kontrollgruppe als bei den Septikern (p=0.02), allerdings zeigte sich hier in der Subgruppenanalyse nur ein Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten mit Gram-positiver Sepsis (p=0.006) (Abb. 4.41D). Außerdem zeigten Granulozyten beider Gruppen keine Zunahme von TLR4 nach Stimulation mit LPS.

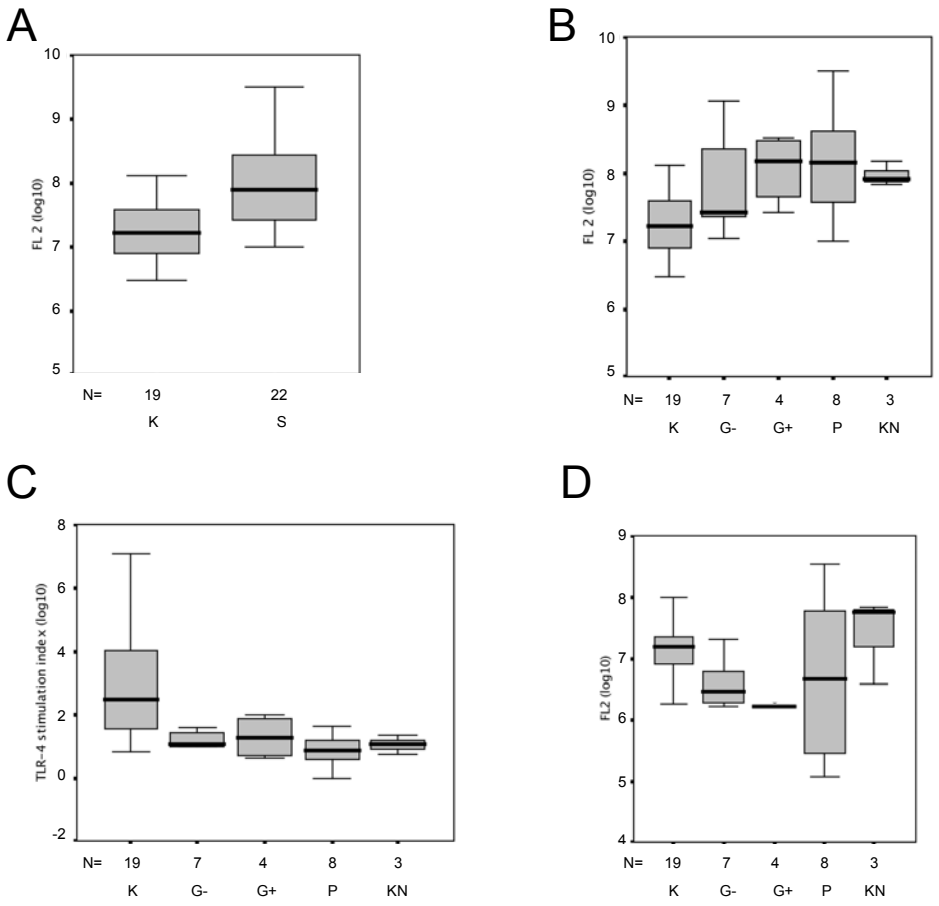


Abb. 4.41: Untersuchung der TLR4 Expression auf Monozyten und Granulozyten von Patienten mit Sepsis und von gesunden Probanden mittels Durchflusszytometrie. Monozyten und Granulozyten wurden mit APC-konjugiertem anti–CD14-Antikörper und im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht identifiziert, die TLR4 Expression wurde mit einem PE- konjugiertem anti-humanem TLR4 Antikörper bestimmt.
(A): TLR4 Expression auf Monozyten von Patienten mit Sepsis (S) und von gesunden Probanden (K).
(B): TLR4 Expression auf Monozyten von gesunden Probanden (K) und von Patienten mit einer Gram-negativen (G-), Gram-positiven (G+), polymikrobiellen (P) oder Kultur-negativen (KN) Sepsis.
(C): Nach *ex vivo* Stimulation mit 40 ng/ml LPS bzw. 0,9% NaCl wurde der TLR4 Stimulationsindex bei gesunden Probanden (K), Patienten mit einer Gram-negativen (G-), Gram-positiven (G+), polymikrobiellen (P) oder Kultur-negativen (KN) Sepsis bestimmt. TLR4 Stimulationsindex: Quotient aus TLR4 Oberflächendichte nach LPS Stimulation und TLR4 Oberflächendichte nach Stimulation mit 0,9% NaCl (ohne Stimulation).
(D): TLR4 Expression auf Granulozyten von gesunden Probanden (K) und Patienten mit einer Gram-negativen (G-), Gram-positiven (G+), polymikrobiellen (P) oder Kultur-negativen (KN) Sepsis. Granulozyten wurden im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht analysiert.

Es fand sich keine Korrelation der TLR4 Expression mit der Schwere der Sepsis oder der Letalität.

5 Diskussion

5.1 TLRs und ihre Rolle in der Pathophysiologie von Infektionskrankheiten

TLRs werden auf vielen verschiedenen Zelltypen des Immunsystems exprimiert. Sie sind die bisher wichtigsten Rezeptoren für die Erkennung von Pathogenen und stehen deshalb im Mittelpunkt vieler Untersuchungen. TLRs scheinen auch in der Pathogenese einiger Autoimmunerkrankungen, sowie chronischen und entzündlichen Erkrankungen eine wichtige Rolle zu spielen. So wurde beispielsweise gezeigt, dass eine Fehlregulation in der Signaltransduktion über TLR mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen assoziiert ist. Kinder mit einer Mutation im IRAK-4 Gen zeigten eine erhöhte Anfälligkeit für pyogene Bakterien (Picard *et al*, 2003; Medvedev *et al*, 2003). Einige Studien konnten außerdem einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen im TLR4 Gen und verschiedenen Infektionskrankheiten wie Meningokokkeninfektionen (Read *et al*, 2001), Gram-negativen Infektionen (Agnese *et al*, 2002), akutem Myokardinfarkt (Edfeldt *et al*, 2004), entzündlicher Darmerkrankungen (Torok *et al*, 2004) oder auch anderen Erkrankungen wie beispielsweise Arteriosklerose (Kiechl *et al*, 2002) und Diabetes (Kolek *et al*, 2004) herstellen. Im Mittelpunkt vieler Untersuchungen stehen vor allem die *single nucleotide polymorphism* (SNP)s Asp299Gly und Thr399Ile im TLR4 Gen, da sie eine signifikant geringere Reaktivität auf LPS zeigen (Schroder & Schumann, 2005).

Eine der schwersten Infektionskrankheiten ist die Sepsis, welche im Falle der Gram-negativen Sepsis meist von LPS, einem TLR4 Ligand, und im Falle der Gram-positiven Sepsis meist von TLR2 Liganden ausgelöst wird. In einer Studie von Lorenz *et al.* konnte nur bei Patienten mit Septischem Schock der SNP Asp299Gly nachgewiesen werden (Lorenz *et al*, 2002). Kürzlich wurde auch ein Polymorphismus im TLR2 Gen des Menschen entdeckt (Lorenz *et al*, 2000a). Eine Korrelation zwischen dem Auftreten der TLR2 Mutation und der Prävalenz der Gram-positiven Sepsis wurde angenommen, konnte jedoch aufgrund zu geringer Fallzahlen statistisch noch nicht bewiesen werden (Lorenz *et al*, 2000b). Alle Studien, die sich um einen Zusammenhang von TLRs und Sepsis bemühen, sind aufgrund der geringen Fallzahlen eher als Pilotstudien anzusehen. Letztlich fehlen die eindeutigen Beweise für eine Rolle von TLRs in der Pathophysiologie der Sepsis im Menschen. Die Aktivierung von TLRs, speziell bei der Sepsis, ist ein zweischneidiges Schwert. Zum einen ist sie notwendig, um die Antwort des angeborenen Immunsystems einzuleiten und die adaptive Immunität gegen Pathogene zu verstärken. Zum anderen kann die ständige Konfrontation mit Pathogenen, wenn sie sich unkontrolliert entwickelt, eine Überreaktion des Immunsystems auslösen. Die Signaltransduktion über TLRs ist also notwendig, sollte

allerdings unter der strengen Kontrolle negativer Regulatoren stehen. Letztendlich resultieren alle TLR assoziierten Krankheiten aus einer Überreaktion der TLRs oder einer Dysregulation der endogenen negativen Regulatorelemente (Liew *et al*, 2005c).

Im Mausmodell gibt es eindeutige Beweise für die wichtige und zweischneidige Rolle von TLRs. TLR4 mutante oder defiziente Mäuse sind zwar resistent gegenüber LPS induziertem Schock (Hoshino *et al*, 1999; Qureshi & Medzhitov, 2003), zeigen jedoch eine hohe Anfälligkeit gegenüber LPS-tragenden Pathogenen, wie beispielsweise *Salmonella typhimurium,* einem natürlich vorkommender Krankheitserreger von Mäusen (O'Brien *et al*, 1980; O'Brien *et al*, 1985).

Demnach ist eine vorsichtige Kontrolle der Signaltransduktion über TLR notwendig, um ein Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Reaktionen auf Pathogene zu finden. Zum einen soll die Erkennung von Pathogenen über TLRs nicht unterbunden werden, da es in diesem Fall zu einer Aktivierung der angeborenen Immunität kommen soll. Zum anderen soll die überschießende Reaktion der angeborenen Immunität verhindert werden, die der Erkennung über TLRs folgen kann, wenn die Signaltransduktion stattgefunden hat. Im Mittelpunkt der derzeitigen Suche nach neuen Therapieoptionen der Sepsis stehen deshalb Untersuchungen mit dem Ziel einer Kontrolle der Signaltransduktion über TLRs. Die bisherigen Versuche werden im Folgenden kurz erläutert.

5.2 Beeinflussung der Signaltransduktion über TLRs

5.2.1 Neutralisierung von LPS

LPS steht, zumindest bei Patienten mit Gram-negativer Infektion, am Beginn der Ereignis-Kaskade, die zu schwerer Sepsis, Multiorganversagen und schließlich zum Tod führt. Deshalb erscheint es prinzipiell sinnvoll, diese Substanz(en) möglichst früh nach der Manifestation von Sepsis-Symptomen aus der Zirkulation zu entfernen (Opal & Gluck, 2003). Hierfür wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Strategien verfolgt:

5.2.1.1 Anti-Endotoxin-Antikörper

Antikörper gegen LPS sind entweder gegen den Polysaccharid-Anteil oder gegen den Kern des Lipid-A-Anteils gerichtet. Im ersten Fall sind sie für den jeweiligen Bakterienstamm spezifisch, im letzteren erreichen sie theoretisch eine breite Kreuzreaktivität gegen LPS von verschiedenen Gram-negativen Bakterien. Durch diese Antikörper kann zirkulierendes LPS gebunden und so die weitere Aktivierung des Immunsystems mit exzessiver Freisetzung von Zytokinen verhindert werden. Die ersten Anti-LPS-Antikörper waren polyklonale Seren, die

durch Impfung von Freiwilligen mit Hitze-inaktiviertem *E. coli 0111-J5* gewonnen wurden. Die erste Studie mit diesem "J5-Serum" zeigte eine reduzierte Letalität bei mikrobiologisch dokumentierter Gram-negativer Sepsis (Ziegler *et al*, 1982). Dieses Ergebnis ließ sich jedoch in nachfolgenden Untersuchungen nicht mehr reproduzieren (Calandra *et al*, 1988; Girardin *et al*, 1992). Später wurden monoklonale Anti-LPS-Antikörper, beispielsweise HA-1A (Centocor), J5 (Xoma) und T88 (Chiron) entwickelt. Jedoch brachten keine der Antikörper einen Gesamtüberlebensvorteil in klinischen Studien (Angus *et al*, 2000; Bone *et al*, 1995; Daifuku *et al*, 1992; McCloskey *et al*, 1994).

5.2.1.2 Modulation der LPS-Signaltransduktion auf der Ebene von CD14

CD14 bindet LPS, überträgt dieses auf den LPS-Rezeptor Komplex (TLR4/MD-2) und stellt somit einen wesentlichen Knotenpunkt bei der Induktion der unspezifischen Immunantwort in der Sepsis dar. Die pharmakologische Beeinflussung von CD14 ist deshalb ein attraktives Ziel für eine Therapieoption der Sepsis. In verschiedenen Tierversuchen konnte die Relevanz von CD14 als therapeutisches *target* bestätigt werden. So zeigten sich beispielsweise CD14 KO Mäuse völlig unempfindlich gegen LPS-Dosen, wohingegen diese bei den CD14 positiven, normalen Kontrollen eine 100%ige Letalität induzierten (Haziot *et al*, 1988). CD14 KO Mäuse waren erwartungsgemäß weniger anfällig für Gram-negative Infektionen, bei unveränderter Empfindlichkeit gegenüber Gram-positiven Erregern (Haziot *et al*, 1999). In einigen Tierversuchen konnte durch Anti-CD14-Antikörper die LPS-induzierte Letalität reduziert werden. Weiter zeigte sich auch in Versuchen an freiwilligen Probanden eine reduzierte proinflammatorische Antwort auf LPS Induktion (Leturcq *et al*, 1996; Verbon *et al*, 2001). Allerdings wurde in einer kürzlich abgeschlossene klinische Phase Ib/II-Studie keine Unterschiede in der Letalität festgestellt werden (Reinhart *et al*, 2004).

5.2.1.3 Lipoproteine und sCD14

LPS wird über verschiedene Eliminationswege aus der Zirkulation entfernt. Ein Weg verläuft über LBP und lösliches CD14 (sCD14) und den anschließenden Transport von LPS zu Lipoproteinen, z.B. *high density lipoprotein*-Partikel, in welchen LPS biologisch inaktiv ist (Kitchens *et al*, 2001; Wurfel *et al*, 1995). Dieses Modell der exogenen Applikation von sCD14 zeigte im Tiermodell erste Erfolge. Zudem wurden auch bei überlebenden Sepsis-Patienten höhere sCD14-Spiegel gemessen (Gluck *et al*, 2001). Die Beweise, dass sCD14 oder Lipoproteine einen therapeutischen Effekt bei Patienten mit Sepsis besitzen, bleiben allerdings bisher aus.

5.2.1.4 Weitere Strategien der Anti-LPS-Behandlung

Es wurden einige andere Versuche unternommen, um LPS möglichst effizient und schnell aus der Zirkulation zu entnehmen, beispielsweise mit Hilfe des *bactericidal/permeability increasing protein* (BPI). BPI gehört zu einer Gruppe von kationischen antibakteriellen Peptiden aus neutrophilen Granulozyten, welche hohe LPS-neutralisierende und antibakterielle Aktivität aufweisen. Des Weiteren gab es Untersuchungen mit Phospholipiden und Lipoproteinen als LPS-Inhibitoren (Gordon & Saal, 1996), außerdem Versuche durch Hämofiltration und Hämoabsorption LPS an Säulen zu absorbieren (Opal, 2000) und das Verfahren der Plasmapherese (Busund *et al*, 2002).

5.2.1.5 Limitationen von Anti-LPS-Strategien

Da LPS und andere mikrobielle Strukturen am Anfang der Sepsis-Kaskade stehen, wäre daraus zu schließen, dass sämtliche auf die Inaktivierung der Wirkung von mikrobiellen Strukturen abzielenden Strategien lediglich in der Frühphase der Sepsis sinnvoll sind. Wenn die gesamte Kaskade aktiviert und durch Mikrozirkulationsstörung ein Organschaden eingetreten ist, scheint eine Intervention am Beginn der Kaskade weniger erfolgsversprechend. Zudem greifen einige der vorgestellten Anti-LPS-Strategien in physiologische Mechanismen zur Eliminierung von Erregern aus dem Organismus ein, wie beispielsweise die Elimination über CD14. Die Beeinflussung solcher Mechanismen könnte daher auch nachteilig sein, wobei der Einsatz von Antibiotika in der klinischen Praxis eventuell eine durch Blockade von CD14 verminderte Elimination von Bakterien kompensieren könnte. Bis jetzt führte jedoch keine der oben beschriebenen Strategien zur LPS-Neutralisierung oder LPS-Entfernung aus der Zirkulation zu einer effizienten neuen Behandlungsmethode der Sepsis.

5.2.2 Beeinflussung der Signaltransduktion über TLR direkt auf der Rezeptor-Ebene

Allen unter 5.2.1 beschriebenen Studien ist gemeinsam, selektiv LPS oder LPS-bindende Proteine abzufangen. Eine Alternative wäre ein direkter Eingriff auf der Ebene des Rezeptors, welcher für die Signaltransduktion verantwortlich ist. Diese Methode hätte den Vorteil, dass ein wesentlich breiteres Spektrum an Liganden beeinflusst würde als in der selektiven Ligandhemmung. TLR4 wird nicht nur von LPS aktiviert (Abreu & Arditi, 2004). Andere potente Aktivatoren sind beispielsweise die *Heat shock proteins* (HSP)s, v.a. HSP 60, welche bei bakteriellen oder viralen Infektionen in großen Mengen freigesetzt werden. Für TLR2 ist eine enorme Vielfalt an Liganden bekannt. Eine Kontrolle der Signaltransduktion auf

Rezeptorebene würde die Aktivierung durch sämtliche Liganden blockieren. Inzwischen gibt es einige Hinweise, dass ein Eingriff in den ersten Schritt der Signaltransduktion über TLRs eine potentielle neue Therapieoption darstellen könnte.

Erste Daten zeigen vor allem in der über TLR2 induzierten Gram-positiven Sepsis einen Erfolg, zumindest im Mausmodell. So konnten Meng *et al.* mit einem neutralisierenden TLR2 Antikörper die Letalität einer Gram-positiven Sepsis im Mausmodell signifikant verringern (Meng *et al*, 2004). Kürzlich zeigten LeBouder *et al.* eine *in vitro* Hemmung der Lipopetid induzierten Signaltransduktion mit löslichem TLR2 aus der Muttermilch (LeBouder *et al*, 2003) und mit einem rekombinant gewonnenen löslichen TLR2-Fc Fusionsprotein. Auch in der LPS induzierten Signaltransduktion über TLR4 gibt es erste Daten, dass ein Eingriff direkt auf der Ebene von TLR4 eine neue Therapieoption für die Gram-negative Sepsis darstellen könnte. Eine Studie von Iwami *et al.* konnte mit löslichem TLR4 in der Mausmakrophagen Zelllinie RAW 264.7 eine signifikante Hemmung der LPS induzierten NF-κB-Aktivierung und TNF-Produktion zeigen (Iwami *et al*, 2000). Kürzlich wurde auch mit löslichem TLR4 und MD-2 eine Hemmung der LPS induzierten IL-8 Produktion in der humanen Zelllinie U937 erreicht (Hyakushima *et al*, 2004) .

In der vorliegenden Dissertation wurde ebenso versucht, direkt auf der Rezeptorebene regulierend einzugreifen. Falls lösliche TLRs die Fähigkeit besitzen, TLR Liganden zu binden, könnten diese als Konkurrenzprodukte zu membranständigen TLRs dienen und somit die Signalkaskaden über TLRs hemmen bzw. kontrollieren. Im Unterschied zu den publizierten Daten von Iwami *et al.* sollte mit rekombinanten Fusionsproteinen eine Hemmung der LPS induzierten proinflammatorischen Kaskade erreicht werden. Iwami *et al.* zeigten nur bei Überexpression von löslichem TLR4 eine signifikante Hemmung der proinflammatorischen Reaktion (Iwami *et al*, 2000). Für lösliches TLR2 existieren die Daten von LeBouder *et al.* im humanen System (LeBouder *et al*, 2003). Die vorliegende Arbeit fokussiert sich allerdings auf das Maus-System, um die mögliche Therapieoption *in vivo* testen zu können.

Die löslichen TLR Fusionsproteine zeigten unterschiedliche funktionelle Charakteristika, die im Folgenden näher diskutiert werden:

5.2.2.1 Beeinflussung der Signaltransduktion über TLR2 mit löslichem TLR2

Überraschenderweise blieb auf Stimulierung der murinen Makrophagen Zelllinie RAW 264.7 mit den TLR2 Aktivatoren Pam3Cys oder LTA in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen T2Fc nicht nur der Hemmeffekt aus; im Gegenteil, es konnte eine positiv synergistische Ausschüttung von proinflammatorischem IL-6 gezeigt werden. Dieser Effekt war spezifisch für lösliches TLR2 und nicht auf den humanen IgGFc-Teil zurückzuführen, da gereinigter löslicher TLR2 (nach Entfernung des huIgGFc-Teils) den gleichen Effekt zeigte.

Außerdem konnte der positive Synergismus sowohl für Pam3Cys als TLR2/TLR1 Ligand, als auch für LTA als TLR2/TLR6 Ligand nachgewiesen werden und ist somit wahrscheinlich nur auf TLR2 zurückzuführen.

Für die Signaltransduktion über TLR4 wurde eine TLR4-Aggregatbildung auf der Zelloberfläche nach Stimulation mit LPS gezeigt. Eine gewisse Anzahl an TLR4 Molekülen scheint nötig zu sein, um die Signalkaskade zu initiieren (Visintin *et al*, 2003). Es ist nicht bekannt, ob dieses Phänomen auch für andere TLRs, speziell für TLR2 in Verbindung mit TLR1 oder TLR6, zutrifft. Falls die Signaltransduktion über TLR2 ähnlich dem TLR4 verläuft, könnte man spekulieren, dass löslicher TLR2 die TLR2-Aggregatbildung stabilisiert und ein stärkeres Signal auslöst.

Im Gegensatz zu den Daten dieser Arbeit zeigte eine Studie von LeBouder *et al*., dass löslicher TLR2 und ein TLR2-Fc Fusionsprotein die Lipopeptid induzierte Aktivierung von humanen MonoMac-6 Zellen hemmte (LeBouder *et al*, 2003). Für diese Diskrepanzen könnte eventuell die unterschiedlichen Regulation der Expression von TLRs im humanen und murinen System mitverantwortlich sein (Rehli, 2002).

5.2.2.2 Beeinflussung der Signaltransduktion über TLR4 mit löslichem TLR4

Auf Zusatz von LPS als TLR4 Stimulus wurde mit dem rekombinanten Fusionsprotein T4Fc die Ausschüttung von IL-6 nicht verändert. Um auszuschließen, dass der huIgGFc-Teil stört, wurden die Experimente auch mit löslichem TLR4 ohne IgGFc durchgeführt. Diese löslichen Rezeptoren zeigten aber auch keinen Einfluss auf die proinflammatorische Reaktion. Ein weiteres biochemisches Problem könnte die Glykosylierung darstellen, die sich bei den Proteinen aus Insektenzellen deutlich von denen der Säugerzellen unterscheidet (Altmann *et al*, 1999). Deshalb wurde auch mit rekombinantem T4Fc aus HEK 293 gearbeitet, ohne jedoch einen Einfluss auf LPS stimulierte RAW 264.7 zu finden. Die unterschiedliche Glykosylierung scheint also kein Grund für den ausbleibenden Effekt von löslichem TLR4 zu sein.

Es ist allerdings inzwischen bekannt, dass MD-2 ein essentieller Bestandteil des LPS-Rezeptor Komplexes ist (Viriyakosol *et al*, 2000; Visintin *et al*, 2003), denn für eine effiziente Stimulation über TLR4 ist MD-2 notwendig (Nagai *et al*, 2002). Der ausbleibende Effekt von T4Fc auf LPS stimulierte RAW 264.7 könnte demnach auf ungenügende Mengen MD-2 zurückzuführen sein. Zum einen könnte die Produktion von MD-2 in der Mausmakrophagen Zelllinie RAW 264.7 nicht ausreichen, um lösliches T4Fc abzusättigen, zum anderen könnte die ungenügende Menge MD-2 auf die Instabilität von MD-2 zurückzuführen sein. Kürzlich wurde gezeigt, dass MD-2 innerhalb 24 h bei physiologischer Temperatur seine Aktivität verliert (Kennedy *et al*, 2004). Mit dem monoklonalen Antikörper MTS 510, welcher

spezifisch für den TLR4/MD-2 Komplex ist, konnte auf Zusatz von T4Fc zu RAW 264.7 der Komplex nicht nachgewiesen werden. MD-2 scheint also entweder nicht an T4Fc zu binden, oder MD-2 ist im Überstand von RAW 264.7 nicht in genügend hohen Konzentrationen vorhanden. Deshalb sollte zunächst rekombinantes MD-2 hergestellt werden, um zum einen die biologische Aktivität von T4Fc zu überprüfen (über die Bindung von MD-2 an T4Fc) und zum anderen die LPS Bindung über den Komplex T4Fc/MD-2 zu untersuchen.

5.2.2.3 Beeinflussung der Signaltransduktion über TLR4 mit dem Komplex T4Fc/MD-2

Zunächst wurde MD-2 zusammen mit T4Fc in HEK 293 Zellen kotransfiziert. In diesen Experimenten konnte eine Bindung von MD-2 an T4Fc nachgewiesen werden. T4Fc scheint also biologisch aktiv zu sein, da es die Fähigkeit besitzt, MD-2 zu binden. Der humane IgGFc-Teil störte die Interaktion zwischen TLR4 und MD-2 offensichtlich nicht. Dies zeigt, wie auch die Daten von Viriyakosol *et al.,* dass nur der extrazelluläre Bereich von TLR4 für die Interaktion mit MD-2 ausreicht (Viriyakosol *et al*, 2000).

Des Weiteren konnte auch die Bindung des T4Fc/MD-2 Komplexes an LPS nachgewiesen werden. Die vorliegenden Daten zeigten, dass der T4Fc/MD-2 Komplex, der mit Hilfe von Kotransfektionsexperimenten generiert wurde, das Potential hatte, LPS zu binden. Zudem war der T4Fc/MD-2 Komplex in der Lage, als Konkurrenzprodukt zum membranständigen LPS-Rezeptor Komplex zu dienen. Die LPS-induzierte IL-6 Sekretion konnte mit dem T4Fc/MD-2 Komplex gehemmt werden. Kürzlich wurden diese Daten auch im humanen System von Hyakushima *et al.* bestätigt (Hyakushima *et al*, 2004). Wie in dieser Arbeit konnten die Autoren zeigen, dass der Komplex aus dem extrazellulären Teil von TLR4 und MD-2 LPS binden kann und dass der Zusatz von löslichem TLR4 zu MD-2 enthaltendem Medium die IL-8 Sekretion in U937 Zellen signifikant verringerte.

Mit Hilfe von Kotransfektionsexperimenten konnten Visintin *et al.* zeigen, dass TLR4 und MD-2 bereits im Endoplasmatischen Retikulum/cis-Golgi assoziieren und erst gemeinsam als funktioneller Komplex die Zelloberfläche erreichen (Visintin *et al*, 2001). Man kann also spekulieren, dass TLR4 und MD-2 in den hier dargestellten Kotransfektionsexperimenten auch bereits im Endoplasmatischen Retikulum/cis-Golgi assoziierten und als biologisch aktiver Komplex sezerniert wurden.

Für einen möglichen therapeutischen Einsatz ist ein solches Vorgehen aber nicht praktikabel, da ein genau definiertes molares Verhältnis (beispielsweise T4Fc:MD-2; 1:1) mit Koexpressionsexperimenten schwierig zu produzieren ist. Deshalb wurde versucht, MD-2 aus S2 Zellen herzustellen, zu reinigen, und dann mit gereinigtem T4Fc den T4Fc/MD-2 Komplex *in vitro* zu generieren. Dieser Versuch schlug fehl, da rekombinantes MD-2 aus S2 zum größten Teil aus inaktiven, über Disulfid-Brücken verknüpften Oligomeren bestand. Die

aktive Komponente von MD-2, das Monomer, war kaum vorhanden. Auch andere Studien beschreiben diese Probleme bei der Herstellung von rekombinantem MD-2 (Mullen *et al*, 2003; Re & Strominger, 2002; Re & Strominger, 2003; Visintin *et al*, 2001). Das rekombinante MD-2, welches kaum aktives Monomer enthielt, war dementsprechend nur äußerst schlecht in der Lage, mit T4Fc zu interagieren. Es gelang also nicht, große Mengen an biologisch aktivem MD-2 in S2 herzustellen.

Wegen der besonderen Eigenschaften und der Instabilität von MD-2 sollte ein neues Molekül generiert werden, welches die zwei Komponenten des LPS-Rezeptor Komplexes, TLR4 und MD-2, in einem Molekül vereinte. Im Falle von LPS sind zumindest diese beiden Komponenten für eine hohe LPS Bindeeffizienz nötig. MD-2 bindet LPS (Viriyakosol *et al*, 2000) und die Anwesenheit von TLR4 verstärkt die Bindung von LPS an MD-2 (Visintin *et al*, 2003). Deshalb erschien ein löslicher Rezeptor, der beide Bestandteile des LPS-Rezeptors enthält, potenter und wirksamer. Dieser „erzwungene“ Komplex sollte auch eine höhere Stabilität aufweisen, da MD-2 nicht mehr vom Komplex abdissoziieren kann.

Es gibt einige Untersuchungen, welche dieselbe Technik zur Bildung hochaktiver Komplexe benutzten. Manche dieser erzwungenen Komplexe haben eine höhere Affinität zu dem Liganden als der natürlich vorkommende Rezeptor. So zeigte ein Fusionsprotein aus dem IL-6 Rezeptor und löslichem IL-6, welches als *Hyper-IL-6* bezeichnet wurde, eine 100-1000fach höhere Aktivität als die beiden Moleküle zusammen (Ozbek *et al*, 2001; Peters *et al*, 1998). Economides *et al.* Stellten *Cytokine traps* aus verschiedenen Zytokin bzw. Zytokinrezeptorkomponenten her. So wurde beispielsweise die IL-4 induzierte Zellproliferation mit einer *IL-4 trap* aus der γ-Kette des IL-2 Rezeptors zusammen mit der α-Kette des IL-4 Rezeptors signifikant stärker gehemmt als mit einem IL-4Rα-Fc Fusionsprotein alleine. Auch proinflammatorische Reaktionen wie beispielsweise die IL-1 induzierte IL-6 Sekretion, konnte mit einer *IL-1 trap*, bestehend aus dem IL-1 Rezeptor *accessory protein* (IL-1RAcP) und IL-1RI, erfolgreich gehemmt werden (Economides *et al*, 2003).

Das Designermolekül LPS-Trap, welches in Analogie zu den *Cytokine traps* generiert wurde, besteht aus dem extrazellulären Teil von TLR4, welcher über einen flexiblen Linker an MD-2 fusioniert ist. C-terminal enthält das Fusionsprotein ein His-Markerpeptid (LPS-Trap) oder alternativ einen huIgGFc-Teil (LPS-Trap-Fc). Die LPS-Trap hatte offensichtlich eine native Konformation. Sie wurde von dem monoklonalen Antikörper, der spezifisch für den TLR4/MD-2 Komplex ist, erkannt, konnte LPS binden, und die Bindung der LPS-Trap an LPS konnte mit dem Antikörper MTS 510 unterbunden werden. Überraschenderweise bestand sowohl die LPS-Trap als auch die LPS-Trap-Fc unter nicht-reduzierenden Bedingungen größtenteils aus einem heterogenen, über Disulfidbrücken verknüpften Oligomerengemisch.

Jedoch war nur die monomere Form der LPS-Trap in der Lage, LPS zu binden. Die beiden LPS-Trap Fusionsproteine schienen also bezüglich der Stabilität und biologischen Aktivität keinen Fortschritt zu dem zuerst generierten T4Fc/MD-2 Komplex darzustellen. Da das Fusionsprotein LPS-Trap prinzipiell funktionierte, war das nächste Ziel, die Ausbeute an biologisch aktiver LPS-Trap zu erhöhen. Die Bildung des heterogenen Proteingemisches ist höchstwahrscheinlich auf MD-2 zurückzuführen. MD-2 verfügt über 7 Cysteine und bildet sehr leicht über Disulfidbrücken verknüpfte Oligomere. Mullen *et al.* zeigten, dass die Bildung von Oligomeren verhindert werden kann, wenn 5 der 7 Cysteine zu Serinen mutiert werden. Die Aktivität des mutierten MD-2 wurde in Kotransfektionsexperimenten mit TLR4 und anschließender NFκB Aktivierung nach LPS Stimulation gemessen. Die NFκB Aktivierung zeigte sich mit dem mutierten MD-2 nur geringfügig verringert. MD-2 scheint also in seiner mutierten Form immer noch biologisch aktiv zu sein (Mullen *et al*, 2003). Folglich könnte ein Austausch von WT MD-2 zu mutiertem MD-2 die starke Oligomerisierung der LPS-Trap verhindern. Dieser Austausch erbrachte allerdings nicht den erwarteten Erfolg. Die neu generierte LPS-Trap mit mutiertem MD-2 bildete wiederum kaum monomeres Produkt. Dies widerspricht den bereits publizierten Daten von Mullen *et al.* Um diese Diskrepanz zu klären, sollte zuerst mutiertes MD-2 alleine exprimiert werden, um dessen Form unter nicht-reduzierenden Bedingungen zu überprüfen. Aufgrund des C-terminalen huIgGFc-Teils des MD-2 (mut.) Plasmids bestand der Großteil des Proteins aus Dimer, jedoch waren kaum Oligomere vorhanden. Die Mutation von 5 Cysteinen zu Serinen verhindert also tatsächlich das Phänomen der Oligomerenbildung.

Nun wurde in Betracht gezogen, dass es sich bei dem Phänomen der Oligomerenbildung auch um einen Aufarbeitungsartefakt handeln könnte. Deshalb sollten in folgenden Experimenten alternative schonendere Aufbereitungsverfahren benutzt werden, um eine Denaturierung der LPS-Trap bei der Aufarbeitung zu vermeiden. Tatsächlich ließen sich die Ausbeuten an biologisch aktiver, monomerer LPS-Trap bei vorhergehender Säulenchromatographie drastisch steigern. Dies konnte sowohl für die LPS-Trap mit mutiertem MD-2 als auch für die LPS-Trap mit WT MD-2 nachgewiesen werden. MD-2 alleine war folglich nicht für die Oligomerenbildung verantwortlich. Des Weiteren konnte zudem nachgewiesen werden, dass LPS-Trap (mut.) und LPS-TrapFc (mut.) nicht mehr in der Lage war, an LPS zu binden. Die Mutationen der Cysteine verändern scheinbar die Fusionsmoleküle in der Art, dass eine Bindung von LPS nicht mehr stattfinden kann.

Nachdem die Probleme bei der Herstellung der LPS-Trap gelöst waren, wurde *in vitro* der Einfluss der LPS-Trap auf LPS-Aktivität untersucht. Zunächst wurde ein Transwell Versuch durchgeführt. In diesem Experiment sezernieren HEK 293T Zellen, welche mit LPS-Trap transfiziert wurden, kontinuierlich LPS-Trap in den Überstand. So liegt bereits ein mit LPS-Trap gesättigtes Medium vor, wenn die Mausmakrophagen zugegeben, und später mit LPS

stimuliert werden. Des Weiteren wird auch ständig neue LPS-Trap nachproduziert, ein wichtiger Faktor, da über die Stabilität der LPS-Trap bis jetzt noch nichts bekannt ist. In diesem Ko-Kultur Experiment zeigten LPS stimulierte RAW 264.7 eine signifikant geringere TNF Produktion als Kontrollen. Die LPS-Trap hemmt demnach LPS-Aktivität *in vitro* und sollte auch *in vivo* zu einer Hemmung der LPS induzierten proinflammatorischen Reaktion führen. Dazu muss ein weiteres Problem gelöst werden.

Für sinnvolle *in vivo* Versuche im Mausmodell müssten große Mengen an rekombinanter LPS-Trap zur Verfügung stehen. Die bisher gewonnenen stabilen Klone von LPS-Trap produzierenden S2 Zellen, wie auch die transiente Transfektion in HEK 293 Zellen reichen für die Produktion großer Mengen LPS-Trap für *in vivo* Studien nicht aus. Deshalb wurden andere Expressionssysteme getestet, welche eventuell zu größeren Ausbeuten an rekombinantem Fusionsprotein führen könnten. Jedoch zeigte keines der Systeme (Expression in COS-7, HEK 293, HEK 293T, CHO) eine deutliche Verbesserung, verglichen mit den Ausbeuten aus S2 Zellen. Lediglich die Expression im Baculovirus-System scheint größere Mengen an LPS-Trap zu liefern, was momentan untersucht wird. Außerdem wurde versucht, neue stabile S2 Transfektanden zu generieren. Mit diesen gelang schließlich die Produktion größerer Mengen an Fusionsprotein. Nach Reinigung erster großer Mengen Überstand konnte bereits ein *in vivo* Pilotexperiment durchgeführt werden. Dieses erste *in vivo* Experiment mit 4 NMRI Mäusen und Gabe von 50 μg LPS i.p. zeigte eine protektive Wirkung der LPS-Trap. Alle Mäuse die mit LPS-Trap behandelt wurden, zeigten deutlich geringere TNF-Serumspiegel als die Kontrollgruppe, welchen PBS und LPS injiziert wurde. Um signifikante Aussagen machen zu können, soll dieser Versuch zunächst mit einer größeren Anzahl an Mäusen wiederholt werden,. Außerdem soll die Kontrollgruppe im nächsten Experiment nicht mit PBS, sondern einem irrelevanten Fusionsprotein, beispielsweise T2Fc behandelt werden, welches in den *in vitro* Experimenten keinen Einfluss auf die proinflammatorische Reaktion zeigte.

Des Weiteren wird die Wirkung der LPS-Trap im Modell der "cecal ligation and puncture" (CLP) getestet werden. Diese Methode gilt als ein klinisch relevantes Tiermodell für septische Peritonitis. Es entsteht dabei eine polymikrobielle, abszedierende Entzündung und in einem Teil der Tiere eine Sepsis. Bei der CLP wird das Coecum der Mäuse nach Laparotomie ligiert und mit einer perforierenden Verletzung durch Nadelstich versehen. Durch die Wahl der Nadelgröße kann die Mortalität der Versuchstiere beeinflusst werden.

Die LPS-Trap soll vor, während und nach der Operation appliziert werden. Neben der Auswirkung auf die Mortalität soll in den geplanten Experimenten auch die Konzentration von Bakterien in den einzelnen Organen bestimmt werden. Da es sich um eine Mischinfektion handelt, könnte es sein, dass trotz nachgewiesener inhibitorischer Wirkung keine klaren Auswirkungen auf die Mortalität erhalten werden. Deshalb könnte eine Therapie selektiv für

Gram-positive Infektionen relativ einfach durch die Gabe von Vancomycin etabliert werden. Auch ein rein Gram-negatives Infektionsmodell wie z.B. durch i.p. Injektion von *Salmonella typhimurium* oder *Pseudomonas aeruginosa* soll als ein weiteres Modell untersucht werden.

Das Designermolekül LPS-Trap hat *in vitro* und in ersten *in vivo* Experimenten eine Hemmung der Entzündungsreaktion gezeigt. Der kontrollierende Eingriff der LPS-Trap auf Ebene des Rezeptors ist eine neuartige Strategie, um die überschießende Reaktion der angeborenen Immunität bei der Sepsis zu kontrollieren. Alle TLR4 aktivierenden Substanzen können, im Gegensatz zu den bisherigen Therapieoptionen, von der LPS-Trap abgefangen werden. Die LPS-Trap hat demnach das Potential einer neuen Therapieoption für die Sepsis.

5.3 Polyklonale und monoklonale Antikörper gegen lösliches TLR2 bzw. TLR4

Bislang sind keine Antikörper gegen murines TLR2 bzw. murines TLR4 kommerziell erhältlich. Lediglich gegen den Komplex TLR4/MD-2 der Maus steht ein funktioneller spezifischer Antikörper zur Verfügung. Deshalb sollten sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper gegen den Extrazellularteil von TLR2 und TLR4 hergestellt werden. Diese Antikörper sollten dann zur Etablierung eines ELISAs für lösliches TLR benutzt werden. Die Immunisierung von Kaninchen erbrachte ein spezifisches Antiserum gegen löslichen TLR4. Mit diesem Serum konnte im Western Blot sowohl spezifisch rekombinantes TLR4 als auch TLR4 in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden. Aus Kaninchen, die mit TLR2 immunisiert wurden, konnte kein spezifisches Antiserum gewonnen werden. Vielleicht sind die immunogenen Anteile von mTLR2 dem TLR2 aus Kaninchen zu ähnlich.
Die Produktion monoklonaler Antikörper gegen lösliches TLR4 in TLR4 defizienten Mäusen erbrachte in der ersten Analyse lediglich neun spezifische Klone, welche sich aber während der Subklonierung als nicht stabil erwiesen. Es wurden insgesamt 1500 Hybridomüberstände im ELISA getestet. Nach dieser Methodik erweisen sich von den initial positiv getesteten Klonen nur etwa 10% als stabil. Deshalb war es nicht unwahrscheinlich, dass sich bei allen der positiv getesteten 9 Klone nach der Subklonierung die Antikörperproduktion einstellte. Die Versuche sollen mit der anderen Hälfte der Milz wiederholt werden. Falls sich einige Klone als spezifisch erweisen und stabil sind, wird zunächst der Isotyp des Antikörpers bestimmt. Anschließend wird der Antikörper gereinigt und charakterisiert.

5.4 Untersuchungen zur Dichte von TLR2 und TLR4 auf Zellen des peripheren Blutes

Die zentrale Rolle von TLR2 und TLR4 in der Induktion der Immunantwort auf Gram-positive und Gram-negative Bakterien ist heute unumstritten (Dziarski*, et al* 2001, Opal und Huber 2002). Es ist allerdings bis jetzt noch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der TLR Expression und der Häufigkeit und Schwere der Sepsis bzw. der Letalität bekannt. Es wäre denkbar, dass ein Unterschied zwischen der TLR Dichte auf Zellen des peripheren Blutes in Patienten mit Sepsis und gesunden Kontrollen besteht. In der vorliegenden Arbeit sollte dieser Zusammenhang untersucht werden. Voraussetzend, dass das Kollektiv der septischen Patienten im Rahmen der Bakteriämie einem *in vivo* LPS Stimulus ausgesetzt war, zeigten die Daten tatsächlich eine direkte Korrelation der TLR4 Dichte auf Monozyten und LPS Stimulation *in vivo* und *in vitro*.

Patienten mit Sepsis zeigten per se eine signifikant höhere TLR4 Dichte auf der Zelloberfläche als gesunde Kontrollen. Außerdem führte eine *ex vivo* Stimulation mit LPS zu einem signifikanten Anstieg von TLR4 auf der Oberfläche von Monozyten gesunder Kontrollen. Im Einklang mit diesen Ergebnissen stehen zwei kürzlich publizierte Studien, welche einen signifikanten Anstieg der TLR4 mRNA Expression nach einer Stimulation mit 1 μg/ml LPS für 2 h bzw. von 100 ng/ml LPS für 4 h zeigten (Armstrong*, et al* 2004, Bosisio*, et al* 2002). Im Gegensatz zu unseren Daten konnte keine der Studien diese erhöhte mRNA Dichte auf Proteinebene nachweisen. Die Autoren spekulieren, dass der größte Teil des mRNA Transkriptes nicht zu Protein translatiert wurde (Armstrong*, et al* 2004). Diese Hypothese steht allerdings im Widerspruch zu unseren Daten und einer Studie von Marsik *et al*. Diese Autoren konnten ebenso einen Anstieg der TLR4 Protein Expression auf einen LPS Stimulus (5 pg/ml LPS für 2 h) nachweisen (Marsik*, et al* 2003).

Der Anstieg der TLR4 Oberflächenexpression bei Patienten mit Sepsis war jedoch in allen Subgruppen zu finden. TLR4 ist verantwortlich für die Signaltransduktion von LPS, einem Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien. Die vorliegenden Daten zeigten aber auch einen Anstieg der TLR4 Expression auf Monozyten von Patienten mit Gram-positiver Sepsis. Allerdings ist die Gruppe der Patienten mit Gram-positiver Sepsis sehr klein (n=4) und man kann eine polymikrobielle Infektion mit Gram-negativen Keimen nicht ausschließen. Das könnte einen Einfluss auf die TLR4 Expression auch im Falle der nachgewiesenen Gram-positiven Erreger erklären.

Im Gegensatz zu den Monozyten gesunder Kontrollpersonen war bei Patienten mit Sepsis auf einen zusätzlichen LPS Stimulus hin kein Anstieg der TLR4 Dichte auf Monozyten zu verzeichnen. Aus diesen Daten könnte man spekulieren, dass die Dichte von TLR4 nach einem LPS Stimulus ein gewisses Maximum erreicht, welches sich auf erneute LPS Gabe

nicht mehr weiter steigern lässt. Dies könnte eine Art Schutzmechanismus der Zelle darstellen, eine mehrmalige Stimulierung mit LPS zu verhindern.

Die Untersuchungen der TLR4 Expression auf Granulozyten von Patienten mit Sepsis im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigten einen gegenteiligen Effekt. Hier war die TLR4 Dichte auf Granulozyten bei den gesunden Probanden signifikant höher als bei den Patienten mit Sepsis. Es konnte auch keine Veränderung auf einen LPS Stimulus (40 ng/ml für 15 min) festgestellt werden. Die Bedeutung und Konsequenzen dieser Ergebnisse sind momentan noch unklar.

Über die Regulation von TLR Expression ist nicht sehr viel bekannt. Man weiß nur, dass TLRs durch Ubiquitinylierung degradiert und die Expression durch anti-inflammatorische Zytokine gehemmt werden kann (Liew *et al*, 2005b).

Ein möglicher Einflussfaktor wäre LPS. Marsik *et al*. beobachteten eine negative Regulation der TLR4 Expression in Neutrophilen von gesunden Probanden nach einem LPS Stimulus *in vivo* und *in vitro* (Marsik*, et al* 2003). Setzt man voraus, dass die Patienten unserer Studie tatsächlich einem natürlichen LPS Stimulus im Verlauf der Sepsis ausgesetzt waren, entsprächen die Daten von Marsik *et al.* denen unserer Studie. Die in der Studie von Marsik *et al.* beobachtete Veränderung der TLR4 Dichte nach LPS Stimulation *in vitro* steht allerdings im Widerspruch zu den Daten der vorliegenden Arbeit. Ein Grund könnte die kürzere Stimulationszeit von 15 min sein, welche in dieser Arbeit benutzt wurde.

Bezüglich der Expression von TLR2 fanden wir keine Unterschiede in der Dichte weder auf Monozyten und Granulozyten noch vor oder nach LPS Stimulation. Im Gegensatz dazu fanden Armstrong *et al.* eine signifikant höhere TLR2 mRNA und -Proteinexpression in Patienten mit Sepsis verglichen zu Gesunden (Armstrong*, et al* 2004). Diese Beobachtung konnte auch von einer anderen Studie bestätigt werden, welche zeigte, dass die TLR2 Expression in Monozyten nach einer LPS Infusion signifikant höher war als in gesunden Kontrollen. Allerdings konnten, wie auch in unseren Daten, keine Unterschiede in der TLR2 Dichte auf Granulozyten nach LPS Stimulation festgestellt werden (Marsik*, et al* 2003). Insgesamt ist die Varianz der verschiedenen Stimulationszeiten und LPS Dosen, welche in all diesen Studien benutzt wurden, zu groß, um direkt vergleichen zu können und signifikante Aussagen zuzulassen. Die vielen widersprüchlichen Ergebnisse der bisherigen Studien, die sich mit der Regulation der TLRs in der Sepsis beschäftigen, zeigen die Komplexizität der regulatorischen Mechanismen der TLRs in der Sepsis. Weitere Studien mit größeren Patientenzahlen und homogeneren Subgruppen sind notwendig, um die Faktoren zu untersuchen, welche in der Regulation der TLRs in der Sepsis eine Rolle spielen und auch klinische Relevanz haben.

6 Zusammenfassung

In der bakteriellen Sepsis gerät das angeborene Immunsystem durch Überflutung mit mikrobiellen Produkten außer Kontrolle. Diese immunbedingte Überaktivierung führt zum Organversagen mit häufig letalem Ausgang. Für die Auslösung einer Immunantwort gegen Gram-negative und Gram-positive Bakterien sind TLR4 und TLR2 verantwortlich. In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Hypothese geprüft, ob eine Kontrolle der Gram-negativen oder Gram-positiven induzierten Signaltransduktion durch Ligand-bindende lösliche Rezeptoren diese Überaktivierung verhindert. Da zur Signaltransduktion durch TLRs mindestens eine Dimerisierung nötig ist, wurden die rekombinanten Fusionsproteine FlagmrsTLR2-IgGFc (T2Fc) und FlagmrsTLR4-IgGFc (T4Fc), bestehend aus dem extrazellulären Teil von TLR2 bzw. 4 und humanem IgG-Fc, der Maus hergestellt. Zur Messung der biologischen Aktivität der Proteine wurden Zellen der murinen Makrophagen Zelllinie RAW 264.7 mit den jeweiligen TLR Aktivatoren stimuliert und anschließend das Zytokin IL-6 im Überstand per ELISA gemessen. Auf Zusatz von T2Fc ergab sich ein positiv synergistischer Effekt auf die Pam3Cys oder LTA induzierte IL-6 Sekretion in RAW 264.7. Hingegen wurde auf Zusatz von LPS als TLR4 Stimulus die Ausschüttung von IL-6 mit dem Fusionsprotein T4Fc nicht verändert. Essentiell für den erwünschten „Hemmeffekt“ von löslichem TLR4 (der Erniedrigung der Synthese proinflammatorischer Zytokine) wäre die Ausbildung des T4Fc/MD-2 Komplexes, der für die LPS Signaltransduktion entscheidend ist. Da dieser im Überstand von RAW 264.7 nicht nachgewiesen werden konnte, wurde des Weiteren rekombinantes Flag-markiertes MD-2 produziert. Koimmunpräzipitations-experimente zeigten, dass MD-2 und T4Fc einen Komplex bildeten, der mit biotinyliertem LPS interagierte, T4Fc hingegen alleine band kein LPS. Der T4Fc/MD-2 Komplex führte auch zu einer Dosis-abhängigen Hemmung der IL-6 Sekretion in LPS stimulierten RAW 264.7. In Analogie zu den so genannten *Cytokine Traps* wurde dann ein Fusionsprotein hergestellt, welches die beiden Komponenten des LPS-Rezeptor Komplexes, TLR4 und MD-2, in einem Molekül vereinte. Der extrazelluläre Teil von TLR4 wurde über einen flexiblen Linker an MD-2 fusioniert. C-terminal enthält die LPS-Trap ein HIS-Markerpeptid oder alternativ einen huIgGFc-Teil. Auch das Designermolekül LPS-Trap war in der Lage, LPS zu binden und führte zu einer Hemmung der LPS-Aktivität *in vitro*. Erste Daten zeigen auch eine erfolgreiche Hemmung *in vivo*. Der Komplex aus T4Fc/MD-2 und auch die LPS-Trap haben somit das Potential einer neuen Therapieoption für die Sepsis.

Ein weiterer Teil der Arbeit untersuchte die Expression von TLR2 und TLR4 auf Monozyten und Granulozyten septischer Patienten im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv. Die TLR2 Expression auf Monozyten und Granulozyten septischer Patienten zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Hingegen war die TLR4

Expression auf den Monozyten septischer Patienten bereits vor Stimulation mit LPS signifikant erhöht. Diese ließ sich jedoch im Gegensatz zu den Zellen des Kontrollkollektives durch LPS nicht weiter steigern. Setzt man voraus, dass das Kollektiv der septischen Patienten im Rahmen der Bakteriämie einem *in vivo* LPS Stimulus ausgesetzt war, zeigen die Daten eine direkte Korrelation der TLR4 Expression auf Monozyten und LPS Stimulation *in vivo* und *in vitro.*

Ein dritter Themenkomplex der Dissertation beschäftigte sich mit der Herstellung monoklonaler und polyklonaler Antikörper gegen löslichen TLR2 bzw. TLR4 zur Etablierung eines ELISAs für lösliches TLR. Es konnte ein spezifisches Antiserum gegen murinen TLR4 gewonnen werden.

7 Abkürzungen

ACCP/SSCM	*American College of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine*
AcP	*accessory protein* (Akzessorisches Protein)
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Adapterprotein-1
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphat
bp	Basenpaare
BSA	*bovine serum albumine* (Rinder Serum Albumin)
Btk	*Bruton´s tyrosine kinase*
CARDs	*caspase-activating and recruitment domain*
CD	*cluster of differentiation* (Differenzierungsfaktor)
CpG	*cytosin-phosphate-guanosin*
DD	*death domain* (Todesdomäne)
DIF	*Dorsal related immunity factor*
DMEM	*Dulbecco`s Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*desoxyribonucleic acid* (Desoxyribonukleinsäure)
DREDD	*Death-related ced-3/Nedd2-like protein*
ds	*double strand* (doppelsträngig)
DTT	Dithiothreitol
ECL	*enhanced chemoluminescence*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	*enzyme-linked-immunosorbent-assay*
Fadd	*FAS-associated death domain*
FCS	*fetal calf serum* (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	*forward scatter* (Vorwärtsstreulicht)
GARG16	*glucocorticoid-attenuated response gene 16*
GNBP1	*Gram-negative bacteria binding protein 1*

GPI	Glykophosphatidylinositol
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	*horseradish peroxidase*
IFN	Interferon
IκB	*inhibitory κB*
IKK	*inhibitory κB kinase* (Inhibitor-κB-Kinase)
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IMD	*immune deficiency*
IP-10	*IFN-inducible protein 10*
IPTG	Isopropyl-thio-galaktosid
IRAK	*IL-1R-assocciated kinase* (IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase)
IRD5	*immune response deficient 5*
IRF	*IFN regulatory factor*
IRG1	*immunoresponsive gene 1*
ISRE	*interferon stimulated response element*
JNK	*c-Jun NH2-terminal kinase*
Kb	Kilobase
LB	*Luria Broth*, Bakterienmedium
LBP	*lipopolysaccharide binding protein* (LPS-bindendes Protein)
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	*leucine rich repeats* (Leucin reiche Regionen)
Lsg.	Lösung
LTA	*lipoteichoic acid* (Lipoteichonsäure)
m	muriner/s
MAPK	*mitogen-activated protein kinase* (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
MCS	*multiple cloning site*
MD-2	*myeloid differentiation-2*
MHC	*major histocompatibility complex*
MOF	*multi organ failure* (Multiorganversagen)

mRNA	*messenger ribonucleic acid* (*messenger* Ribonukleinsäure)
MyD88	*myeloid differentiation protein 88*
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitro blue tetrazolium chlorid
NEMO	*NF-κB essential modulator*
NF-κB	*nuclear factor κB* (Nukleärer Faktor κB)
NMRI	Naval Medical Research Institute
NOD	*nucleotidebinding-oligomerization-domain*
nt	Nukleotide
P/S	Penicillin / Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAI-1	*plasminogen activator inhibitor-1*
Pam3Cys	(S)-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys_4-OH]
PBS	*phosphate buffered salt solution* (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	*polymerase chain reaction* (Polymerase Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PE	Phycoerythrin
PGRP	*peptidoglycan-recognition protein*
PRR	*pathogen recognition receptors*
r	rekombinant
Rip2	*receptor interacting protein 2*
RNA	*ribonucleic acid* (Ribonukleinsäure)
rpm	*rounds per minute* (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S2	Schneider S2
SAPS	*simplified acute physiology score*
SDS	*sodium dodecyl sulfate* (Natriumdodecylsulfat)
SIRS	*systemic inflammatory response syndrome*
s	*soluble* (löslich)
ss	*single strand* (Einzelstrang)
SSC	*sideward scatter* (Seitwärtsstreulicht)

sTLR	*soluble TLR* (löslicher TLR)
T2Fc	FlagmrsTLR2-huIgGFc
T4Fc	FlagmrsTLR4-huIgGFc
Tab.	Tabelle
TAB	*TAK1 binding protein* (TAK-1-bindendes Protein)
TAK-1	*transforming growth factor β activated kinase 1* (TGFβ-aktivierte Kinase-1)
TF	*tissue factor*
TICAM	*TIR domain containing adaptor molecule*
TIR	Toll/IL-1R-Domäne
TIRAP	*TIR domain containing adaptor protein*
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	*tumor necrosis factor* (Tumor-Nekrose-Faktor)
TRAF	*tumor necrosis factor receptor-associated factor*
TRAM	*TRIF related adaptor molecule*
WT	Wildtyp

8 Literaturverzeichnis

Abreu,M.T. & Arditi,M. (2004) Innate immunity and toll-like receptors: clinical implications of basic science research. *J.Pediatr.*, 144, 421-429.

Aderem,A. & Underhill,D.M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.Rev.Immunol.*, 17, 593-623.

Aderka,D., Englemann,H., Hornik,V., Skornick,Y., Levo,Y., Wallach,D., & Kushtai,G. (1991) Increased serum levels of soluble receptors for tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Res.*, 51, 5602-5607.

Aderka,D., Wysenbeek,A., Engelmann,H., Cope,A.P., Brennan,F., Molad,Y., Hornik,V., Levo,Y., Maini,R.N., Feldmann,M., & . (1993) Correlation between serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 36, 1111-1120.

Agnese,D.M., Calvano,J.E., Hahm,S.J., Coyle,S.M., Corbett,S.A., Calvano,S.E., & Lowry,S.F. (2002) Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J.Infect.Dis.*, 186, 1522-1525.

Akashi,S., Nagai,Y., Ogata,H., Oikawa,M., Fukase,K., Kusumoto,S., Kawasaki,K., Nishijima,M., Hayashi,S., Kimoto,M., & Miyake,K. (2001) Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *Int.Immunol.*, 13, 1595-1599.

Akashi,S., Shimazu,R., Ogata,H., Nagai,Y., Takeda,K., Kimoto,M., & 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, 3471-3475.

Akira,S. (2003) Toll-like receptor signaling. *J.Biol.Chem.*, 278, 38105-38108.

Akira,S. & Hoshino,K. (2003) Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling. *J.Infect.Dis.*, 187 Suppl 2, S356-S363.

Altmann,F., Staudacher,E., Wilson,I.B., & Marz,L. (1999) Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj.J.*, 16, 109-123.

Anderson,K.V. & Nüsslein-Volhard,C. (1984) Information for the dorsal--ventral pattern of the Drosophila embryo is stored as maternal mRNA. *Nature*, 311, 223-227.

Angus,D.C., Birmingham,M.C., Balk,R.A., Scannon,P.J., Collins,D., Kruse,J.A., Graham,D.R., Dedhia,H.V., Homann,S., & Macintyre,N. (2000) E5 murine monoclonal antiendotoxin antibody in gram-negative sepsis: a randomized controlled trial. E5 Study Investigators. *JAMA*, 283, 1723-1730.

Angus,D.C., Linde-Zwirble,W.T., Lidicker,J., Clermont,G., Carcillo,J., & Pinsky,M.R. (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.*, 29, 1303-1310.

Arbour,N.C., Lorenz,E., Schutte,B.C., Zabner,J., Kline,J.N., Jones,M., Frees,K., Watt,J.L., & Schwartz,D.A. (2000) TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat.Genet.*, 25, 187-191.

Arch,R.H., Gedrich,R.W., & Thompson,C.B. (1998) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev.*, 12, 2821-2830.

Athman,R. & Philpott,D. (2004) Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr.Opin.Microbiol.*, 7, 25-32.

Au,W.C., Moore,P.A., Lowther,W., Juang,Y.T., & Pitha,P.M. (1995) Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 92, 11657-11661.

Bauer,S. & Wagner,H. (2002) Bacterial CpG-DNA licenses TLR9. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 270, 145-154.

Beutler,B. & Rietschel,E.T. (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat.Rev.Immunol.*, 3, 169-176.

Bone,R.C., Balk,R.A., Fein,A.M., Perl,T.M., Wenzel,R.P., Reines,H.D., Quenzer,R.W., Iberti,T.J., Macintyre,N., & Schein,R.M. (1995) A second large controlled clinical study of E5, a monoclonal antibody to endotoxin: results of a prospective, multicenter, randomized, controlled trial. The E5 Sepsis Study Group. *Crit Care Med.*, 23, 994-1006.

Bone,R.C., Sibbald,W.J., & Sprung,C.L. (1992) The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest*, 101, 1481-1483.

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., & Modlin,R.L. (1999) Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*, 285, 732-736.

Brown,G.D., Herre,J., Williams,D.L., Willment,J.A., Marshall,A.S., & Gordon,S. (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J.Exp.Med.*, 197, 1119-1124.

Busund,R., Koukline,V., Utrobin,U., & Nedashkovsky,E. (2002) Plasmapheresis in severe sepsis and septic shock: a prospective, randomised, controlled trial. *Intensive Care Med.*, 28, 1434-1439.

Butty,V.L., Roux-Lombard,P., Garbino,J., Dayer,J.M., & Ricou,B. (2003) Anti-inflammatory response after infusion of p55 soluble tumor necrosis factor receptor fusion protein for severe sepsis. *Eur.Cytokine Netw.*, 14, 15-19.

Calandra,T., Glauser,M.P., Schellekens,J., & Verhoef,J. (1988) Treatment of gram-negative septic shock with human IgG antibody to Escherichia coli J5: a prospective, double-blind, randomized trial. *J.Infect.Dis.*, 158, 312-319.

Cohen,J. (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420, 885-891.

Cope,A.P., Aderka,D., Doherty,M., Engelmann,H., Gibbons,D., Jones,A.C., Brennan,F.M., Maini,R.N., Wallach,D., & Feldmann,M. (1992) Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.*, 35, 1160-1169.

Daifuku,R., Haenftling,K., Young,J., Groves,E.S., Turrell,C., & Meyers,F.J. (1992) Phase I study of antilipopolysaccharide human monoclonal antibody MAB-T88. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 36, 2349-2351.

Downes,S.M. (2004) Alternative splicing, the gene concept, and evolution. *Hist Philos.Life Sci.*, 26, 91-104.

Dunne,A. & O'Neill,L.A. (2003) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci.STKE.*, 2003, re3.

Economides,A.N., Carpenter,L.R., Rudge,J.S., Wong,V., Koehler-Stec,E.M., Hartnett,C., Pyles,E.A., Xu,X., Daly,T.J., Young,M.R., Fandl,J.P., Lee,F., Carver,S., McNay,J., Bailey,K., Ramakanth,S., Hutabarat,R., Huang,T.T., Radziejewski,C., Yancopoulos,G.D., & Stahl,N. (2003) Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nat.Med.*, 9, 47-52.

Edfeldt,K., Bennet,A.M., Eriksson,P., Frostegard,J., Wiman,B., Hamsten,A., Hansson,G.K., de Faire,U., & Yan,Z.Q. (2004) Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. *Eur.Heart J.*, 25, 1447-1453.

Ehlers,M.R. (2000) CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes.Infect.*, 2, 289-294.

Ehrenstein,M.R., Evans,J.G., Singh,A., Moore,S., Warnes,G., Isenberg,D.A., & Mauri,C. (2004) Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J.Exp.Med.*, 200, 277-285.

Febbraio,M., Hajjar,D.P., & Silverstein,R.L. (2001) CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J.Clin.Invest*, 108, 785-791.

Fitzgerald,K.A., Palsson-McDermott,E.M., Bowie,A.G., Jefferies,C.A., Mansell,A.S., Brady,G., Brint,E., Dunne,A., Gray,P., Harte,M.T., McMurray,D., Smith,D.E., Sims,J.E., Bird,T.A., & O'Neill,L.A. (2001) Mal

(MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*, 413, 78-83.

Fraser,I.P., Koziel,H., & 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, 363-372.

Galley,H.F. & Webster,N.R. (1996) The immuno-inflammatory cascade. *Br.J.Anaesth.*, 77, 11-16.

Gay,N.J. & Keith,F.J. (1991) Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*, 351, 355-356.

Ghosh,S., May,M.J., & Kopp,E.B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.*, 16, 225-260.

Girardin,E., Roux-Lombard,P., Grau,G.E., Suter,P., Gallati,H., & Dayer,J.M. (1992) Imbalance between tumour necrosis factor-alpha and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococcaemia. The J5 Study Group. *Immunology*, 76, 20-23.

Gluck,T., Silver,J., Epstein,M., Cao,P., Farber,B., & Goyert,S.M. (2001) Parameters influencing membrane CD14 expression and soluble CD14 levels in sepsis. *Eur.J.Med.Res.*, 6, 351-358.

Gordon,B.R. & Saal,S.D. (1996) Current status of low density lipoprotein-apheresis for the therapy of severe hyperlipidemia. *Curr.Opin.Lipidol.*, 7, 381-384.

Goyert,S.M., Ferrero,E., Rettig,W.J., Yenamandra,A.K., Obata,F., & Le Beau,M.M. (1988) The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science*, 239, 497-500.

Gutierrez-Ramos,J.C. & Bluethmann,H. (1997) Molecules and mechanisms operating in septic shock: lessons from knockout mice. *Immunol.Today*, 18, 329-334.

Haziot,A., Chen,S., Ferrero,E., Low,M.G., Silber,R., & Goyert,S.M. (1988) The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J.Immunol.*, 141, 547-552.

Haziot,A., Hijiya,N., Schultz,K., Zhang,F., Gangloff,S.C., & Goyert,S.M. (1999) CD14 plays no major role in shock induced by Staphylococcus aureus but down-regulates TNF-alpha production. *J.Immunol.*, 162, 4801-4805.

Heaney,M.L. & Golde,D.W. (1996) Soluble cytokine receptors. *Blood*, 87, 847-857.

Heaney,M.L. & Golde,D.W. (1998) Soluble receptors in human disease. *J.Leukoc.Biol.*, 64, 135-146.

Herz,J. & Strickland,D.K. (2001) LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J.Clin.Invest*, 108, 779-784.

Hirschfeld,M., Kirschning,C.J., Schwandner,R., Wesche,H., Weis,J.H., Wooten,R.M., & Weis,J.J. (1999) Cutting edge: inflammatory signaling by Borrelia burgdorferi lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J.Immunol.*, 163, 2382-2386.

Hirschfeld,M., Ma,Y., Weis,J.H., Vogel,S.N., & Weis,J.J. (2000) Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J.Immunol.*, 165, 618-622.

Hober,D., Benyoucef,S., Delannoy,A.S., De Groote,D., Ajana,F., Mouton,Y., & Wattre,P. (1996a) High plasma level of soluble tumor necrosis factor receptor type II (sTNFRII) in asymptomatic HIV-1-infected patients. *Infection*, 24, 213-217.

Hober,D., Benyoucef,S., Delannoy,A.S., De Groote,D., Ajana,F., Mouton,Y., & Wattre,P. (1996b) Plasma levels of sTNFR p75 and IL-8 in patients with HIV-1 infection. *Immunol.Lett.*, 52, 57-60.

Hoebe,K., Georgel,P., Rutschmann,S., Du,X., Mudd,S., Crozat,K., Sovath,S., Shamel,L., Hartung,T., Zahringer,U., & Beutler,B. (2005) CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*, 433, 523-527.

Honda,K., Yanai,H., Negishi,H., Asagiri,M., Sato,M., Mizutani,T., Shimada,N., Ohba,Y., Takaoka,A., Yoshida,N., & Taniguchi,T. (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, 434, 772-777.

Horng,T., Barton,G.M., & Medzhitov,R. (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat.Immunol.*, 2, 835-841.

Hoshino,K., Takeuchi,O., Kawai,T., Sanjo,H., Ogawa,T., Takeda,Y., Takeda,K., & Akira,S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J.Immunol.*, 162, 3749-3752.

Hotchkiss,R.S. & Karl,I.E. (2003) The pathophysiology and treatment of sepsis. *N.Engl.J.Med.*, 348, 138-150.

Hyakushima,N., Mitsuzawa,H., Nishitani,C., Sano,H., Kuronuma,K., Konishi,M., Himi,T., Miyake,K., & Kuroki,Y. (2004) Interaction of soluble form of recombinant extracellular TLR4 domain with MD-2 enables lipopolysaccharide binding and attenuates TLR4-mediated signaling. *J.Immunol.*, 173, 6949-6954.

Inohara,N., Chamaillard,M., McDonald,C., & Nunez,G. (2004) NOD-LRR Proteins: Role in Host-Microbial Interactions and Inflammatory Disease. *Annu.Rev.Biochem.*

Iwami,K.I., Matsuguchi,T., Masuda,A., Kikuchi,T., Musikacharoen,T., & Yoshikai,Y. (2000) Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J.Immunol.*, 165, 6682-6686.

Janeway,C.A., Jr. & Medzhitov,R. (2002b) Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.*, 20, 197-216.

Janeway,C.A., Jr. & Medzhitov,R. (2002a) Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.*, 20, 197-216.

Janssens,S. & Beyaert,R. (2002) A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem.Sci.*, 27, 474-482.

Jones,B.W., Means,T.K., Heldwein,K.A., Keen,M.A., Hill,P.J., Belisle,J.T., & Fenton,M.J. (2001) Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J.Leukoc.Biol.*, 69, 1036-1044.

Karin,M. & Ben Neriah,Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu.Rev.Immunol.*, 18, 621-663.

Kennedy,M.N., Mullen,G.E., Leifer,C.A., Lee,C., Mazzoni,A., Dileepan,K.N., & Segal,D.M. (2004) A complex of soluble MD-2 and lipopolysaccharide serves as an activating ligand for Toll-like receptor 4. *J.Biol.Chem.*, 279, 34698-34704.

Kiechl,S., Lorenz,E., Reindl,M., Wiedermann,C.J., Oberhollenzer,F., Bonora,E., Willeit,J., & Schwartz,D.A. (2002) Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N.Engl.J.Med.*, 347, 185-192.

Kimoto,M., Nagasawa,K., & Miyake,K. (2003) Role of TLR4/MD-2 and RP105/MD-1 in innate recognition of lipopolysaccharide. *Scand.J.Infect.Dis.*, 35, 568-572.

Kitchens,R.L., Thompson,P.A., Viriyakosol,S., O'Keefe,G.E., & Munford,R.S. (2001) Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *J.Clin.Invest*, 108, 485-493.

Kolek,M.J., Carlquist,J.F., Muhlestein,J.B., Whiting,B.M., Horne,B.D., Bair,T.L., & Anderson,J.L. (2004) Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. *Am.Heart J.*, 148, 1034-1040.

Latz,E., Schoenemeyer,A., Visintin,A., Fitzgerald,K.A., Monks,B.G., Knetter,C.F., Lien,E., Nilsen,N.J., Espevik,T., & Golenbock,D.T. (2004) TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat.Immunol.*, 5, 190-198.

Latz,E., Visintin,A., Lien,E., Fitzgerald,K.A., Monks,B.G., Kurt-Jones,E.A., Golenbock,D.T., & Espevik,T. (2002) Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J.Biol.Chem.*, 277, 47834-47843.

LeBouder,E., Rey-Nores,J.E., Rushmere,N.K., Grigorov,M., Lawn,S.D., Affolter,M., Griffin,G.E., Ferrara,P., Schiffrin,E.J., Morgan,B.P., & Labeta,M.O. (2003) Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J.Immunol.*, 171, 6680-6689.

Lehr,R.V., Elefante,L.C., Kikly,K.K., O'Brien,S.P., & Kirkpatrick,R.B. (2000) A modified metal-ion affinity chromatography procedure for the purification of histidine-tagged recombinant proteins expressed in Drosophila S2 cells. *Protein Expr.Purif.*, 19, 362-368.

Lemaitre,B. (2004) The road to Toll. *Nat.Rev.Immunol.*, 4, 521-527.

Leturcq,D.J., Moriarty,A.M., Talbott,G., Winn,R.K., Martin,T.R., & Ulevitch,R.J. (1996) Antibodies against CD14 protect primates from endotoxin-induced shock. *J.Clin.Invest*, 98, 1533-1538.

Levi,M., de Jonge,E., van der,P.T., & ten Cate,H. (1999) Disseminated intravascular coagulation. *Thromb.Haemost.*, 82, 695-705.

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., & Golenbock,D.T. (1999) Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J.Biol.Chem.*, 274, 33419-33425.

Liew,F.Y., Xu,D., Brint,E.K., & O'neill,L.A. (2005a) Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat.Rev.Immunol.*, 5, 446-458.

Liew,F.Y., Xu,D., Brint,E.K., & O'neill,L.A. (2005c) Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat.Rev.Immunol.*, 5, 446-458.

Liew,F.Y., Xu,D., Brint,E.K., & O'neill,L.A. (2005b) Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat.Rev.Immunol.*, 5, 446-458.

Lorenz,E., Mira,J.P., Cornish,K.L., Arbour,N.C., & Schwartz,D.A. (2000a) A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect.Immun.*, 68, 6398-6401.

Lorenz,E., Mira,J.P., Cornish,K.L., Arbour,N.C., & Schwartz,D.A. (2000b) A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect.Immun.*, 68, 6398-6401.

Lorenz,E., Mira,J.P., Frees,K.L., & Schwartz,D.A. (2002) Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch.Intern.Med.*, 162, 1028-1032.

Marshall,J.C. (2001) Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med.*, 29, S99-106.

McCloskey,R.V., Straube,R.C., Sanders,C., Smith,S.M., & Smith,C.R. (1994) Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CHESS Trial Study Group. *Ann.Intern.Med.*, 121, 1-5.

Medvedev,A.E., Lentschat,A., Kuhns,D.B., Blanco,J.C., Salkowski,C., Zhang,S., Arditi,M., Gallin,J.I., & Vogel,S.N. (2003) Distinct mutations in IRAK-4 confer hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and interleukin-1 in a patient with recurrent bacterial infections. *J.Exp.Med.*, 198, 521-531.

Medzhitov,R. & Janeway,C., Jr. (2000) Innate immunity. *N.Engl.J.Med.*, 343, 338-344.

Medzhitov,R. & Janeway,C.A., Jr. (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr.Opin.Immunol.*, 9, 4-9.

Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., & Janeway,C.A., Jr. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388, 394-397.

Meng,G., Rutz,M., Schiemann,M., Metzger,J., Grabiec,A., Schwandner,R., Luppa,P.B., Ebel,F., Busch,D.H., Bauer,S., Wagner,H., & Kirschning,C.J. (2004) Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J.Clin.Invest*, 113, 1473-1481.

Mohler,K.M., Torrance,D.S., Smith,C.A., Goodwin,R.G., Stremler,K.E., Fung,V.P., Madani,H., & Widmer,M.B. (1993) Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J.Immunol.*, 151, 1548-1561.

Mullen,G.E., Kennedy,M.N., Visintin,A., Mazzoni,A., Leifer,C.A., Davies,D.R., & Segal,D.M. (2003) The role of disulfide bonds in the assembly and function of MD-2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100, 3919-3924.

Mullis,K., Faloona,F., Scharf,S., Saiki,R., Horn,G., & Erlich,H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, 51 Pt 1, 263-273.

Nagai,Y., Akashi,S., Nagafuku,M., Ogata,M., Iwakura,Y., Akira,S., Kitamura,T., Kosugi,A., Kimoto,M., & Miyake,K. (2002) Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat.Immunol.*, 3, 667-672.

O'Brien,A.D., Rosenstreich,D.L., Scher,I., Campbell,G.H., MacDermott,R.P., & Formal,S.B. (1980) Genetic control of susceptibility to Salmonella typhimurium in mice: role of the LPS gene. *J.Immunol.*, 124, 20-24.

O'Brien,A.D., Weinstein,D.A., Soliman,M.Y., & Rosenstreich,D.L. (1985) Additional evidence that the Lps gene locus regulates natural resistance to S. typhimurium in mice. *J.Immunol.*, 134, 2820-2823.

O'Neill,L.A. (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci.STKE.*, 2000, RE1.

O'Neill,L.A. & Dinarello,C.A. (2000) The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol.Today*, 21, 206-209.

Opal,S.M. (2000) Hemofiltration-absorption systems for the treatment of experimental sepsis: is it possible to remove the "evil humors" responsible for septic shock? *Crit Care Med.*, 28, 1681-1682.

Opal,S.M. & Cross,A.S. (1999) Clinical trials for severe sepsis. Past failures, and future hopes. *Infect.Dis.Clin.North Am.*, 13, 285-97, vii.

Opal,S.M. & Gluck,T. (2003) Endotoxin as a drug target. *Crit Care Med.*, 31, S57-S64.

Oshiumi,H., Matsumoto,M., Funami,K., Akazawa,T., & Seya,T. (2003a) TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat.Immunol.*, 4, 161-167.

Oshiumi,H., Sasai,M., Shida,K., Fujita,T., Matsumoto,M., & Seya,T. (2003b) TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J.Biol.Chem.*, 278, 49751-49762.

Ozbek,S., Peters,M., Breuhahn,K., Mann,A., Blessing,M., Fischer,M., Schirmacher,P., Mackiewicz,A., & Rose-John,S. (2001) The designer cytokine hyper-IL-6 mediates growth inhibition and GM-CSF-dependent rejection of B16 melanoma cells. *Oncogene*, 20, 972-979.

Ozinsky,A., Smith,K.D., Hume,D., & Underhill,D.M. (2000) Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. *J.Endotoxin.Res.*, 6, 393-396.

Peters,M., Blinn,G., Solem,F., Fischer,M., Meyer zum Buschenfelde,K.H., & Rose-John,S. (1998) In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6. *J.Immunol.*, 161, 3575-3581.

Picard,C., Puel,A., Bonnet,M., Ku,C.L., Bustamante,J., Yang,K., Soudais,C., Dupuis,S., Feinberg,J., Fieschi,C., Elbim,C., Hitchcock,R., Lammas,D., Davies,G., Al Ghonaium,A., Al Rayes,H., Al Jumaah,S., Al Hajjar,S., Al Mohsen,I.Z., Frayha,H.H., Rucker,R., Hawn,T.R., Aderem,A., Tufenkeji,H., Haraguchi,S., Day,N.K., Good,R.A., Gougerot-Pocidalo,M.A., Ozinsky,A., & Casanova,J.L. (2003) Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science*, 299, 2076-2079.

Poltorak,A., He,X., Smirnova,I., Liu,M.Y., Van Huffel,C., Du,X., Birdwell,D., Alejos,E., Silva,M., Galanos,C., Freudenberg,M., Ricciardi-Castagnoli,P., Layton,B., & Beutler,B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282, 2085-2088.

Qureshi,S.T. & Medzhitov,R. (2003) Toll-like receptors and their role in experimental models of microbial infection. *Genes Immun.*, 4, 87-94.

Re,F. & Strominger,J.L. (2002) Monomeric recombinant MD-2 binds toll-like receptor 4 tightly and confers lipopolysaccharide responsiveness. *J.Biol.Chem.*, 277, 23427-23432.

Re,F. & Strominger,J.L. (2003) Separate functional domains of human MD-2 mediate Toll-like receptor 4-binding and lipopolysaccharide responsiveness. *J.Immunol.*, 171, 5272-5276.

Read,R.C., Pullin,J., Gregory,S., Borrow,R., Kaczmarski,E.B., di Giovine,F.S., Dower,S.K., Cannings,C., & Wilson,A.G. (2001) A functional polymorphism of toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease. *J.Infect.Dis.*, 184, 640-642.

Rehli,M. (2002) Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol.*, 23, 375-378.

Reinhart,K., Gluck,T., Ligtenberg,J., Tschaikowsky,K., Bruining,A., Bakker,J., Opal,S., Moldawer,L.L., Axtelle,T., Turner,T., Souza,S., & Pribble,J. (2004) CD14 receptor occupancy in severe sepsis: results of a phase I clinical trial with a recombinant chimeric CD14 monoclonal antibody (IC14). *Crit Care Med.*, 32, 1100-1108.

Rutschmann,S., Kilinc,A., & Ferrandon,D. (2002) Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in Drosophila. *J.Immunol.*, 168, 1542-1546.

Sato,T.A., Widmer,M.B., Finkelman,F.D., Madani,H., Jacobs,C.A., Grabstein,K.H., & Maliszewski,C.R. (1993) Recombinant soluble murine IL-4 receptor can inhibit or enhance IgE responses in vivo. *J.Immunol.*, 150, 2717-2723.

Schlag,G. & Redl,H. (1996) Mediators of injury and inflammation. *World J.Surg.*, 20, 406-410.

Schroder,J., Stuber,F., Gallati,H., Schade,F.U., & Kremer,B. (1995) Pattern of soluble TNF receptors I and II in sepsis. *Infection*, 23, 143-148.

Schroder,N.W. & Schumann,R.R. (2005) Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect.Dis.*, 5, 156-164.

Schromm,A.B., Lien,E., Henneke,P., Chow,J.C., Yoshimura,A., Heine,H., Latz,E., Monks,B.G., Schwartz,D.A., Miyake,K., & Golenbock,D.T. (2001) Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J.Exp.Med.*, 194, 79-88.

Schumann,R.R., Leong,S.R., Flaggs,G.W., Gray,P.W., Wright,S.D., Mathison,J.C., Tobias,P.S., & Ulevitch,R.J. (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*, 249, 1429-1431.

Schwandner,R., Dziarski,R., Wesche,H., Rothe,M., & Kirschning,C.J. (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J.Biol.Chem.*, 274, 17406-17409.

Schwid,S.R. & Noseworthy,J.H. (1999) Targeting immunotherapy in multiple sclerosis: a near hit and a clear miss. *Neurology*, 53, 444-445.

Shimazu,R., Akashi,S., Ogata,H., Nagai,Y., Fukudome,K., Miyake,K., & Kimoto,M. (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J.Exp.Med.*, 189, 1777-1782.

Shulman,M., Wilde,C.D., & Kohler,G. (1978) A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature*, 276, 269-270.

Stamm,S., Ben Ari,S., Rafalska,I., Tang,Y., Zhang,Z., Toiber,D., Thanaraj,T.A., & Soreq,H. (2005) Function of alternative splicing. *Gene*, 344, 1-20.

Staropoli,I., Frenkiel,M.P., Megret,F., & Deubel,V. (1997) Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice. *Vaccine*, 15, 1946-1954.

Taga,T., Hibi,M., Hirata,Y., Yawata,H., Natsuka,S., Yasukawa,K., Totsuka,T., Yamasaki,K., Hirano,T., & Kishimoto,T. (1989) Interleukin-6 receptor and a unique mechanism of its signal transduction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, 54 Pt 2, 713-722.

Takaoka,A., Yanai,H., Kondo,S., Duncan,G., Negishi,H., Mizutani,T., Kano,S., Honda,K., Ohba,Y., Mak,T.W., & Taniguchi,T. (2005) Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*, 434, 243-249.

Takeda,K. & Akira,S. (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int.Immunol.*, 17, 1-14.

Takeda,K., Takeuchi,O., & Akira,S. (2002) Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *J.Endotoxin.Res.*, 8, 459-463.

Takeuchi,O., Hoshino,K., Kawai,T., Sanjo,H., Takada,H., Ogawa,T., Takeda,K., & Akira,S. (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.*, 11, 443-451.

Takeuchi,O., Kawai,T., Muhlradt,P.F., Morr,M., Radolf,J.D., Zychlinsky,A., Takeda,K., & Akira,S. (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int.Immunol.*, 13, 933-940.

Takeuchi,O., Sato,S., Horiuchi,T., Hoshino,K., Takeda,K., Dong,Z., Modlin,R.L., & Akira,S. (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J.Immunol.*, 169, 10-14.

Tapping,R.I., Akashi,S., Miyake,K., Godowski,P.J., & 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, 5780-5787.

Thompson,P.A., Tobias,P.S., Viriyakosol,S., Kirkland,T.N., & Kitchens,R.L. (2003) Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits responses to cell-bound LPS. *J.Biol.Chem.*, 278, 28367-28371.

Torok,H.P., Glas,J., Tonenchi,L., Mussack,T., & Folwaczny,C. (2004) Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin.Immunol.*, 112, 85-91.

Towbin,H., Staehelin,T., & Gordon,J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 76, 4350-4354.

Ulevitch,R.J. & 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., & Aderem,A. (1999a) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, 401, 811-815.

Underhill,D.M., Ozinsky,A., Smith,K.D., & Aderem,A. (1999b) Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96, 14459-14463.

Vaughn,J.L., Goodwin,R.H., Tompkins,G.J., & McCawley,P. (1977) The establishment of two cell lines from the insect Spodoptera frugiperda (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*, 13, 213-217.

Verbon,A., Dekkers,P.E., ten Hove,T., Hack,C.E., Pribble,J.P., Turner,T., Souza,S., Axtelle,T., Hoek,F.J., van Deventer,S.J., & van der,P.T. (2001) IC14, an anti-CD14 antibody, inhibits endotoxin-mediated symptoms and inflammatory responses in humans. *J.Immunol.*, 166, 3599-3605.

Viriyakosol,S., Fierer,J., Brown,G.D., & Kirkland,T.N. (2005) Innate immunity to the pathogenic fungus Coccidioides posadasii is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infect.Immun.*, 73, 1553-1560.

Viriyakosol,S., Kirkland,T., Soldau,K., & Tobias,P. (2000) MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J.Endotoxin.Res.*, 6, 489-491.

Visintin,A., Latz,E., Monks,B.G., Espevik,T., & Golenbock,D.T. (2003) Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-like receptor-4 aggregation and signal transduction. *J.Biol.Chem.*, 278, 48313-48320.

Visintin,A., Mazzoni,A., Spitzer,J.A., & Segal,D.M. (2001) Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98, 12156-12161.

Werling,D. & Jungi,T.W. (2003) TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet.Immunol.Immunopathol.*, 91, 1-12.

Wright,S.D., Ramos,R.A., Tobias,P.S., Ulevitch,R.J., & Mathison,J.C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249, 1431-1433.

Wurfel,M.M., Hailman,E., & Wright,S.D. (1995) Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. *J.Exp.Med.*, 181, 1743-1754.

Yamamoto,M., Sato,S., Hemmi,H., Uematsu,S., Hoshino,K., Kaisho,T., Takeuchi,O., Takeda,K., & Akira,S. (2003) TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat.Immunol.*, 4, 1144-1150.

Yamamoto,M., Sato,S., Mori,K., Hoshino,K., Takeuchi,O., Takeda,K., & Akira,S. (2002) Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J.Immunol.*, 169, 6668-6672.

Yarovinsky,F., Zhang,D., Andersen,J.F., Bannenberg,G.L., Serhan,C.N., Hayden,M.S., Hieny,S., Sutterwala,F.S., Flavell,R.A., Ghosh,S., & Sher,A. (2005) TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*, 308, 1626-1629.

Ziegler,E.J., McCutchan,J.A., Fierer,J., Glauser,M.P., Sadoff,J.C., Douglas,H., & Braude,A.I. (1982) Treatment of gram-negative bacteremia and shock with human antiserum to a mutant Escherichia coli. *N.Engl.J.Med.*, 307, 1225-1230.

9 Anhang

9.1 Danksagungen

Für seine großzügige Unterstützung danke ich **Herrn Prof. Dr. Jürgen Schölmerich** sehr herzlich; er ermöglichte die Arbeit. Ich habe mich als Apothekerin im Kreis der Ärzte der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I immer wohl und gut aufgenommen gefühlt.

Sehr herzlich danke ich meinem Betreuer, **Herrn Prof. Dr. Werner Falk**. Er hat meine wissenschaftliche Arbeit so begleitet, wie sich dies eine Doktorandin nur wünschen kann und war stets offen für all meine Fragen und Bitten; seine Geduld war grenzenlos. Er hat mich außerordentlich unterstützt und mir darüber hinaus auch einen wertvollen Gedankenaustausch auf internationalen Kongressen ermöglicht.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Franz möchte ich für die Bereitschaft danken, die fakultätsinterne Vertretung dieser Dissertation zu übernehmen, wodurch diese Promotion erst möglich wurde. Ich danke ihm auch für sein Engagement während meines Studiums und für die positive Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Ganz herzlich habe ich **Frau Dr. Pia Hartmann** (MaJ) zu danken. Sie stand mir immer und in allen Bereichen helfend zur Seite. Ihr Rat, ihre Fürsorge und ihr Humor haben misslungene Experimente und manch tristen Labortag vergessen lassen. Es tut gut, sie um sich zu wissen!

Herr PD Dr. Thomas Glück hat mich hilfsbereit unterstützt und stand jederzeit für spannende Diskussionen zur Verfügung. Ich danke ihm für viele wertvolle Anregungen und aufschlussreiche Gespräche. Gleichermaßen helfende und fördernde Unterstützung erfuhr ich von **Herrn Prof. Dr. Bernd Salzberger**. Er verfolgte meine Arbeit mit außerordentlichem Interesse. **Frau Prof. Dr. Daniela Männel** danke ich für die Journal Clubs, in denen ich viel lernen und mein Interesse in die Wissenschaft vertiefen konnte. Die Seminare (Abbas Club und Genetics Club) von **Herrn PD Dr. Michael Rehli** waren eine wertvolle Ergänzung meiner Forschungsarbeit. Beim Herstellen von Antikörpern und den *in vivo* Experimenten haben mir **Herr Dr. Bernd Echtenacher** und **Herr PD Dr. Caspar Franzen** kompetent geholfen. Ich danke beiden sehr herzlich. Für den technischen Rat bei der Durchführung der Experimente möchte ich mich bei **Lisa Aschenbrenner, Kirstin Pollinger** und **Daniela Vogel** bedanken.

Erwähnen will ich die angenehme, kameradschaftliche Arbeitsatmosphäre im Forschungsbau HI. Durch meine Mitforscher, insbesondere **Carol El Chartouni, Monika Lichtinger und Dr. Achim Ehrnsperger**, gab es auch an den „schwarzen Tagen“ der Wissenschaft ein Licht am Ende des Tunnels. Danken möchte ich auch **Herrn Dr. Arne Schneidewind** für unterhaltsame Kloniernächte im Labor.

Meine Stimmungen und „emotionalen Forschungsergebnisse“ haben meine **Eltern** aufgefangen. Ich danke herzlich für den immerwährenden „Bereitschaftsdienst“!

Meinem **Bruder Johannes** widme ich diese Arbeit. Ich bin unglaublich stolz auf ihn und auf seine Stärke, mit der er in den vergangenen Monaten Unannehmbares vorbildlich angenommen hat.

Zuletzt möchte ich meinem Freund **Bernd** danken, ohne ihn wäre nichts so schön, wie es jetzt ist!

9.2 Publikationen

Originalarbeiten

Brandl K., Glück T., Salzberger B., Hartmann P., Falk W.:
A designed TLR4/MD-2 complex to capture LPS.
Journal of Endotoxin Research, 2005; Vol. 11 No. 4

Brandl K., Glück T., Huber C., Salzberger B., Falk W., Hartmann P.:
TLR4 display on human monocytes is increased in septic patients.
European Journal of Medical Research, 2005; in Druck.

Patente

Brandl K., Falk W.: Recombinant TLR-MD-2 fusion proteins, 2004
European Patent Office, Patent No.:04026819.5-2405:

Vorträge

Brandl K., Glück T., Salzberger B., Hartmann P., Falk W.:
A complex of soluble TLR4 and MD-2 blocks LPS activity *in vitro*.
Endotoxin Meeting, Kyoto, Japan, 15.-18. November 2004

Brandl K., Glück T., Salzberger B., Hartmann P., Falk W.:
Design und Herstellung einer LPS-Trap.
Bayerische Chemotherapietage, Grainau, 7.-8. Juli 2005

Posterbeiträge

Brandl K., Schneidewind A., Glück T., Salzberger B., Falk W.:
Modulation of TLR2 and 4 signaling by soluble TLRs.
Toll Meeting, Taormina, Sizilien, 08.-11. Mai 2004

Brandl K., Glück T., Salzberger B., Hartmann P., Falk W.:
A complex of soluble TLR4 and MD-2 blocks LPS activity *in vitro*.
Endotoxin Meeting, Kyoto, Japan, 15.-18. November 2004
Journal of Endotoxin Research 2004; 10: 335

Brandl K., Glück T., Huber C., Salzberger B., Falk W., Hartmann P.:
TLR4 display on human monocytes is increased in septic patients.
Endotoxin Meeting, Kyoto, Japan, 15.-18. November 2004

Journal of Endotoxin Research 2004; 10: 372

Brandl K., Glück T., Salzberger B., Hartmann P., Falk W.:
Ein Komplex aus löslichem TLR4 und MD-2 hemmt LPS Aktivierung *in vitro*- eine neue Therapieoption für die Sepsis?
111. Internistenkongress, Wiesbaden, 02.-06. April 2005
Medizinische Klinik 2005; 100: 46

Brandl K., Glück T., Huber C., Salzberger B., Falk W., Hartmann P.:
Differentielle TLR2 und TLR4 Expression auf Monozyten und Granulozyten septischer Patienten.
111. Internistenkongress, Wiesbaden, 02.-06. April 2005
Medizinische Klinik 2005; 100: 50

9.3 Lebenslauf

Katharina Brandl

geboren am 07.02.1977 in Regensburg

Schule/Studium	1983 – 1987	Kreuzschule Regensburg
	1987 - 1996	Goethe-Gymnasium Regensburg Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife
	ab 1996	Studium der Pharmazie an der Universität Regensburg
	März 1999	Erster Abschnitt der pharmazeutischen Staatsprüfung
	März 2001	Zweiter Abschnitt der pharmazeutischen Staatsprüfung
	Mai 2001	Praktisches Jahr: Yamanouchi Europe Meppel, Niederlande
	November 2001	Praktisches Jahr: Engel-Apotheke, Regensburg
	Juni 2002	Dritter Abschnitt der pharmazeutischen Staatsprüfung
Beruflicher Werdegang	Juli 2002	Assistentin am Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie, Prof. Dr. G. Franz, Universität Regensburg

	seit Oktober 2002	Doktorandin am Lehrstuhl Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Prof. Dr. J. Schölmerich, Klinikum der Universität Regensburg Thema der Promotion: Untersuchungen zur pharmakologischen Beeinflussung der Toll-like Rezeptoren in der Sepsis Angeleitet von Prof. Dr. W. Falk, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Klinikum der Universität Regensburg und Prof. Dr. G. Franz, Pharmazeutische Biologie, Universität Regensburg
Besondere Interessen	1993-1999	Gaststudium Hauptfach Violoncello an der Hochschule für Musik Nürnberg/Augsburg
	1993-1996	Mitglied des Bayerischen Landesjugendorchesters
Sprachkenntnisse	Englisch, Niederländisch, Französisch	
Auszeichnungen/Preise	1995	Erster Preis beim Landeswettbewerb „Jugend musiziert“ in der Kategorie Klaviertrio
	1996	Zweiter Preis beim Landeswettbewerb „Jugend musiziert“ in der Kategorie Violoncello solo
	2005	„Young Investigators Award“ der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin

9.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitates gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeldliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

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

Regensburg, 10.08.2005

_____

(Katharina Brandl)