

**Die Expression von funktionellen
Toll-like Rezeptoren auf humanen Hautendothelzellen
als essentieller Faktor in der Entzündungsreaktion**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nicole Fitzner

aus Düsseldorf

Dezember 2006

Aus dem Institut für Molekulare Medizin, Forschungsgruppe Immunbiologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Victoria Kolb-Bachofen

Koreferent: Prof. Dr. Heinz Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2007

*"Vergiß diejenigen nicht, die Deine Lebensleiter festgehalten haben,
während Du von einer Stufe zur anderen hochgestiegen bist."*

*Gerlinde Nyncke (*1925) aus "Weggefährten - Gedanken und Aphorismen"*

In diesem Sinne möchte ich danken

Frau Prof. Kolb-Bachofen, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für hilfreiche Tipps und Tricks im Laboralltag und für die ständige Diskussionsbereitschaft,

Herrn Prof. Mehlhorn, für die Betreuung meiner Arbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,

allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe Immunbiologie für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre,

meinen Freunden sowie meinen Eltern.

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

Publikationen:

- Fitzner, Nicole & Kolb-Bachofen, Victoria
Functional expression of Toll-like receptors (TLRs) on human endothelial cells activate the inducible Nitric Oxide Synthase.
European Journal of Cell Biology, Vol. 85: S1, Suppl. 56, 2006 (Meeting Abstract)
- Nicole Fitzner, Sigrid Clauberg & Victoria Kolb-Bachofen
Endothelial Cells of the Human Skin Can Express All Ten tlr-Genes and Respond to Respective Ligands.
[Eingereicht.]

Kongresse, Workshops etc.:

2006

- Second Joint French-German NO Meeting (including 11. NO-Forum of the Gesellschaft für NO-Forschung der deutschsprachigen Länder e.V. and Annual Meeting of the Club NO Francais) (Hamburg), Vortrag
- German Society for Cell Biology: Annual Meeting 2006 (Braunschweig), Posterpräsentation

2005

- 11. Workshop: Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung (Xanten), Vortrag
- 10. NO-Forum (Köln), Vortrag
- Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses (Düsseldorf), Posterpräsentation
- 13. Atherosklerose-Symposium (Erfurt), Posterpräsentation

2004

- 1st International Conference of Molecular Research in Environmental Medicine (Düsseldorf), Posterpräsentation
- 9. NO-Forum (Mainz), Posterpräsentation

2003

- 10. Workshop: Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung (Xanten), Vortrag

Andere Formen der Veröffentlichung:

- Victoria Kolb-Bachofen, Miriam Cortese, Jörg Liebmann, Sabine Koch und Nicole Fitzner
Regulation der Entzündungsreaktion: Eine wichtige Rolle für Stickstoffmonoxid
Jahrbuch der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2006

Abkürzungsverzeichnis

AP	Adaptorprotein
BSA	Rinderserumalbumin
C/EBP	CCAAT/Enhancer-bindendes Protein
CD	Differenzierungscluster
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLD	Chemilumineszenzdetektion
cNOS	konstitutiv exprimierte Stickstoffmonoxid-Synthase
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
CR	Komplementrezeptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothelzellen
ECGS/H	Wachstumssupplement für humane Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Endothelialer Wachstumsfaktor
ELISA	Enzymgekoppelter Immunsorptionstest
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fötale Kälber Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GPX	Glutathionperoxidase
HDMEC	Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
HIV	menschliches Immunschwächevirus
HMEC-1	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen
HPRT	Hypoxanthine-guanin phosphoribosyltransferase
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRAK	IL-1-Rezeptorassoziierte Kinase
IRF	IFN-regulierender Faktor
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LFA	Leukozyten-funktionelles Antigen
L-NIO	L-N-(Iminoethyl)-ornithin-dihydrochlorid
LPS	Lipopolysaccharid
LRRs	Leucin-reiche Abschnitte
LTA	Lipoteichonsäure
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEM	N-Ethylmaleimid
NF	Nukleärer Faktor
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid

NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotid
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PECAM	Thrombozyten-/Endothelzell-Adhäsionsmolekül
PGN	Peptidoglykan
PmB	Polymyxin B
RIP	Rezeptorinteragierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Reaktive Sauerstoff-Intermediate
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RXNO	Nitrosoverbindungen
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SIRS	Systemisches Inflammatorisches Responsives Syndrom
SOD	Superoxiddismutase
Std	Stunde
Taq	Taq-Polymerase
TBK	TANK-bindende Kinase
TBS	Tris-gepufferte Saline
tGPI	Glykosylphosphatidylinositol-verankertes Glykoprotein
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne
TIRAP	Toll/IL-1-Rezeptordomäne enthaltendes Adaptorprotein
TLR	Toll-like Rezeptor
TLRs	Toll-like Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes Faktor
TRAM	TRIF-verwandtes Adaptormolekül
TRIF	Toll/IL-1-Rezeptordomäne enthaltender IFN- β induzierender Adaptor
U	Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCAM	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül

INHALTVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	PATHOGENERKENNUNG DURCH TOLL-LIKE REZEPTOREN ALS AUSLÖSER VON ENTZÜNDUNGSREAKTIONEN	1
1.2	TLR-EXPRESSION AUF HUMANEN ZELLEN	6
1.3	DIE BEDEUTUNG DES ENDOTHEL IN DER ENTZÜNDUNGSREAKTION	8
1.4	RELEVANZ DES CHEMOKINS INTERLEUKIN-8	10
1.5	BEDEUTUNG DER INDUZIERBAREN NO-SYNTHESE	11
1.6	UV-STRAHLUNG ALS AUSLÖSER VON ENTZÜNDUNGSREAKTIONEN	14
1.7	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	16
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	MATERIAL	18
2.1.1	<i>Gebrauchsmaterialien</i>	18
2.1.1.1	<i>Geräte</i>	18
2.1.1.2	<i>Glaswaren</i>	19
2.1.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	19
2.1.2.1	<i>Chemikalien</i>	19
2.1.2.2	<i>Plastikartikel</i>	20
2.1.3	<i>Kits</i>	20
2.1.4	<i>Zellen, Zellkulturmedien und Zusätze</i>	20
2.1.5	<i>Lösungen und Puffer</i>	22
2.2	METHODEN	23
2.2.1	<i>Kultur primärer dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen</i>	23
2.2.2	<i>Kultur immortalisierter mikrovaskulärer Endothelzellen</i>	23
2.2.3	<i>Mycoplasmen-PCR</i>	23
2.2.4	<i>Einfrieren von Zellen</i>	24
2.2.5	<i>Auftauen von Zellen</i>	24
2.2.6	<i>Aktivierung der Zellen mit Zytokinen</i>	24
2.2.7	<i>Verwendung des NOS-Inhibitors L-NIO</i>	24
2.2.8	<i>Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht</i>	24
2.2.9	<i>Vitalitätsassay</i>	25
2.2.10	<i>Inkubation der Zellen mit TLR-spezifischen Liganden</i>	25
2.2.10.1	<i>Pam₃Cys</i>	25
2.2.10.2	<i>Lipoteichonsäure</i>	25
2.2.10.3	<i>Peptidoglycan</i>	26
2.2.10.4	<i>Poly(I:C)</i>	26
2.2.10.5	<i>Lipopolysaccharid</i>	26
2.2.10.6	<i>Flagellin</i>	26
2.2.10.7	<i>Imiquimod</i>	26
2.2.10.8	<i>CpG-DNA</i>	26
2.2.11	<i>Nachweis der Abwesenheit von Endotoxin in den TLR-spezifischen Liganden</i>	26
2.2.12	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	27
2.2.13	<i>Chemilumineszenzdetektion</i>	27
2.2.14	<i>Proteinbestimmung</i>	28
2.2.15	<i>Isolierung und Quantifizierung von RNA</i>	28
2.2.16	<i>Reverse Transkription</i>	29
2.2.17	<i>Konventionelle PCR</i>	29
2.2.18	<i>Real-time PCR</i>	30

2.2.19	<i>Immunzytochemie</i>	33
2.2.20	<i>Statistische Methoden</i>	33
3	ERGEBNISSE	34
3.1	TLR-GENEXPRESSION AUF ENDOTHELZELLEN.....	34
3.1.1	<i>Ruhende Endothelzellen exprimieren die meisten der zehn bekannten TLR-Gene</i>	34
3.1.2	<i>Zeitreihenuntersuchungen zur TLR-Expression</i>	37
3.1.3	<i>Differentielle Modulation der TLR-Genexpression auf Endothelzellen durch verschiedene Entzündungsstimuli</i>	38
3.1.3.1	<i>Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die TLR-Genexpression</i>	39
3.1.3.2	<i>Einfluss von UVA-Strahlung auf die TLR-Genexpression</i>	41
3.1.3.3	<i>Einfluss von UVB-Strahlung auf die TLR-Genexpression</i>	44
3.2	TLRS AUF ENDOTHELZELLEN WERDEN FUNKTIONELL EXPRIMIERT	49
3.2.1	<i>TLR-spezifische Liganden modulieren die Freisetzung des Chemokins IL-8 aus Endothelzellen</i>	49
3.2.2	<i>TLR-spezifische Liganden modulieren die Expression der induzierbaren NO-Synthase in Endothelzellen</i>	56
3.2.3	<i>Die Genexpression der TLRs ist iNOS-abhängig</i>	62
3.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR ENDOTOXIN-KONTAMINATION DER TLR-SPEZIFISCHEN LIGANDEN	64
3.3.1	<i>Einfluss von Polymyxin B auf das Aktivierungspotential von Endotoxin</i>	64
3.3.2	<i>Überprüfung der verwendeten TLR-Liganden durch Co-Inkubation mit Polymyxin B</i>	65
3.4	EXPRESSION EINES TLR7-PSEUDOGENS AUF PRIMÄREN ENDOTHELZELLEN	67
4	DISKUSSION	72
4.1	ENDOTHELZELLEN ALS GEEIGNETES ZELLKULTURMODEL.....	72
4.2	TLR-EXPRESSION AUF HUMANEN ENDOTHELZELLEN	73
4.2.1	<i>TLR-Expression auf ruhenden Endothelzellen</i>	73
4.2.2	<i>Modulation der TLR-Expression bei Zytokine-aktivierten Endothelzellen</i>	73
4.3	TLR-SPEZIFISCHE LIGANDEN LÖSEN EINE IMMUNANTWORT AUF ENDOTHELZELLEN AUS	75
4.3.1	<i>TLRs werden funktionell auf humanen Endothelzellen exprimiert</i>	75
4.3.2	<i>Peptidoglykan ist kein TLR2-, TLR1/2- oder TLR2/6-Ligand</i>	79
4.3.3	<i>Ausschluss von Kontaminations-Effekten</i>	80
4.3.4	<i>TLR-Expression in humaner Haut</i>	81
4.4	FEEDBACK-MECHANISMUS ZWISCHEN TLRS UND iNOS	82
4.5	EINFLUSS VON UVA- UND UVB-STRAHLUNG AUF DIE TLR-EXPRESSION	84
4.6	EXPRESSION EINES TLR7-PSEUDOGENS	86
5	ZUSAMMENFASSUNG	88
6	ABSTRACT	90
7	LITERATURVERZEICHNIS	92
8	LEBENS LAUF	101

1 Einleitung

1.1 **Pathogenerkennung durch Toll-like Rezeptoren als Auslöser von Entzündungsreaktionen**

Pathogene infizieren den Wirt über die epithelialen Oberflächen der Haut und der Mukosa. Normalerweise stehen dem Wirtsorganismus durch die funktionellen Eigenschaften der (Schleim-)Haut ausreichend Mechanismen zur Verfügung, um Pathogene bereits am Eindringen in den Wirt zu hindern. Liegt jedoch eine Verletzung der Haut, in der Regel eine (Mikro-)Wunde, vor, gelingt es dem Pathogen meist relativ einfach, in den Wirtsorganismus einzudringen. Aufgrund der schnellen Vermehrungsfähigkeit von Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten müssen schnelle und wirksame Mechanismen zur Abwehr gefunden werden. In den meisten Fällen wird diese Aufgabe erfolgreich vom natürlichen Immunsystem erfüllt. Es bildet eine erste Verteidigungslinie und erkennt bzw. bekämpft alle körperfremden Strukturen, die die Oberflächengewebe Haut und Mukosa überwunden haben. Immunzellen, die dem natürlichen Immunsystem angehören, besitzen für diese Aufgabe Keimbahn-kodierte Rezeptoren, die membranständig lokalisiert sind. Diese Rezeptoren erkennen evolutionär konservierte Strukturen, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP), die weitestgehend für alle Mikroorganismen und Viren einer Art identisch sind. Eine wichtige Gruppe dieser Keimbahn-kodierten Rezeptoren stellen die Toll-like Rezeptoren (TLRs) dar (1-4).

Ursprünglich wurde das Protein Toll in *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo es in der Embryogenese für die dorsoventrale Polarität verantwortlich ist. Ferner stellt Toll zusätzlich die Immunabwehr von *Drosophila* gegen Befall mit Pilzen dar. Mittels bioinformatischer Unterstützung konnten "Toll-like"-Sequenzen auch in Vertebraten identifiziert werden (3, 5-7).

Bis heute sind im humanen System zehn verschiedene Toll-like Rezeptoren identifiziert worden, die alle unterschiedliche Strukturen, spezifische Strukturgruppen oder einzelne Moleküle erkennen. Durch Rezeptor/Ligand-Bindung wird über entsprechende Signalkaskaden eine Entzündungsreaktion ausgelöst (3).

TLRs liegen entweder als Monomer (TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9 und TLR10), als Heterodimer (TLR1/2 oder TLR2/6, eventuell TLR4/5) oder vermutlich auch als homologes Dimer (TLR2/2) vor. Sechs der Rezeptoren sind an der Plasmamembran

lokalisiert (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR10), die übrigen vier befinden sich an der Endosomenmembran (TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9) (1, 8).

Neben einigen endogenen Liganden, die bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen können, existieren eine ganze Reihe exogener Liganden bakteriellen, viralen, fungalen bzw. parasitären Ursprungs, die bis heute identifiziert worden sind. Mittels TLR-defizienter Mäuse und Überexpressionsexperimenten mit einzelnen TLR-Genen in einfachen Zellkulturmodellen können die verschiedenen Liganden ihren jeweiligen Rezeptoren zugeordnet werden (9-13). Tabelle 1 gibt eine Übersicht bekannter pathogen-assoziiertes, exogener Liganden wieder, die für TLRs spezifisch sind.

TLR	Exogene Liganden
TLR1/2:	Pam ₃ Cys (synthetisches Analogon zum tripalmitoyliertem Lipopeptid), triacetylierte Lipopeptide (verschiedene Bakterien und Mykobakterien), 19 kDa-Lipopeptid (Mykobakterien)
TLR2:	Lipoteichonsäure, tGPI-Mutin (<i>T. cruzi</i>), äußeres Membranprotein A (<i>K. pneumoniae</i>), Lipoarabinomannan, Phosphatidylinositoldimannosid, Glykolipid LAM (Mykobakterien), Hemagglutinin (Masern), Porine (Neisseria), Phospholipomannan (<i>C. albicans</i>), Glucoonoxylmannan (<i>C. neoformans</i>)
TLR3:	doppelsträngige RNA (Viren) sowie das synthetische Analoga Poly(I:C)
TLR4:	LPS (Gram-negative Bakterien), Glucuronoxylomannan (<i>C. neoformans</i>), Glycoinositolphospholipids (Trypanosomen)
TLR5:	Flagellin (verschiedene bewegliche Bakterien)
TLR2/6:	diacetylierte Lipopeptide (verschiedene Bakterien und Mykobakterien), phenol-lösliches Modulín (<i>S. epidermidis</i>), Zymosan (<i>S. cerevisiae</i>), tGPI-Mutin (<i>T. cruzi</i>)
TLR7:	einzelsträngige RNA aus Viren (z. B. Influenzavirus, HIV-1), synthetische Guanosin-Analoga
TLR8:	einzelsträngige RNA aus Viren (z. B. HIV-1), synthetische Guanosin-Analoga
TLR9:	unmethylierte CpG-DNA aus Viren
TLR10:	bis heute kein Ligand identifiziert

Tab. 1: Übersicht exogener TLR-Liganden. Dargestellt sind verschiedene exogene TLR-Liganden, um die Vielfalt der Pathogenerkennung dieser Rezeptoren zu verdeutlichen. Die Daten sind aus Akira *et al.* (2006) und Kang *et al.* (2006) entnommen (1, 14).

In dieser Arbeit wurden folgende Liganden verwendet:

- *Pam₃Cys* ist ein synthetisches tripalmitoyliertes Lipopeptid, welches den acetylierten Aminoterminus des bakteriellen Lipoproteins darstellt. Bakterielle Lipoproteine sind proinflammatorisch wirksame Zellwandbestandteile Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien. Pam₃Cys bindet an das TLR1/TLR2-Heterodimer (15).
- *Lipoteichonsäure (LTA)* ist eine stark immunstimulatorische Komponente Gram-positiver Bakterien und ist häufiger Verursacher der Sepsis. Es besteht aus einem hydrophilen Phosphat-Polymer, welches mit einem Glycolipid verknüpft ist. LTA wird durch den TLR2, unter Beteiligung des LPS-bindenden Proteins sowie CD14, erkannt (16, 17).
- *Peptidoglycan (PGN)* ist ein Oberflächenmolekül Gram-positiver sowie Gram-negativer Bakterien. Zunächst wurde angenommen, dass PGN durch TLR2 detektiert wird (16, 18). In jüngerer Zeit kristallisiert sich jedoch immer mehr heraus, dass PGN durch die Oberflächenrezeptoren NOD1 und NOD2 detektiert wird. NOD1/NOD2 gehören ebenfalls zur Gruppe der Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems (19-21).
- *Polyinosin-Polycytidylsäure (Poly(I:C))* stellt ein synthetisches Analog zur doppelsträngigen RNA von Viren dar und wird durch den TLR3 detektiert (22).
- *Lipopolysaccharid (LPS)* wird historisch auch als Endotoxin bezeichnet. Es setzt sich aus drei Abschnitten zusammen. Lipid A, bestehend aus bis zu sechs Fettsäuren und zwei bis drei Glucosaminen, ist für die toxische Wirkung des LPS verantwortlich. Die Kernzone des LPS wird von einem Oligosaccharid gebildet. Das O-Antigen ist der immunogene Anteil des LPS und bildet die verschiedenen Chemotypen aus bis zu 40 sich wiederholenden Zuckern. LPS ist charakteristisch für Gram-negative Bakterien, wo es in der äußeren Membran lokalisiert ist. Es wird durch den TLR4 in Kooperation mit CD14 und MD-2 detektiert (11, 23).
- *Flagellin* ist Bestandteil des bakteriellen Flagellum-Filamentes und kommt sowohl bei Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien vor. Es wird durch den TLR5 detektiert (24).
- *Imiquimod* ist ein immunstimulatorisches Imidazoquinolin, ein Guanosin-Analogen, welches in zahlreichen Studien eine zytostatische Wirkung gezeigt hat. Imiquimod wird im humanen System durch TLR7 erkannt und löst die Aktivierung des

Transkriptionsfaktors NF- κ B aus und setzt verschiedene Zytokine (u. a. IFN- α) frei (25).

- *CpG-DNA* ist ein synthetisches Oligonukleotid, welches unmethylierte CpG-Dinukleotide enthält. Das CpG-Motiv in bakterieller, genomischer DNA ist der native Ligand. Der entsprechende Rezeptor ist der TLR9. Es werden verschiedene Arten an CpG-DNA, je nach Funktionalität, unterschieden: Kontroll-ODN (das CpG-Motiv ist durch ein nicht-funktionelles GpC-Motiv ersetzt), inhibitorische ODN (diese DNA-Sequenzen heben die stimulatorischen Effekte der CpG-DNA auf) und stimulatorische ODN (starke immunstimulatorische Wirkung durch die Anwesenheit unmethylierter CpG-Motive). In der vorliegenden Arbeit wird stimulatorische CpG-DNA vom Typ-A verwendet. Sie ist charakterisiert durch die vorzugsweise Aktivierung plasmatoider Dendritischer Zellen, die daraufhin IFN- α freisetzen, sowie durch die ausbleibende Wirkung auf die Proliferation von B-Zellen (26-28).

TLRs sind Transmembranproteine. Der extrazelluläre Anteil der TLRs besteht aus Leucinreichen Abschnitten (LRRs). Der zytoplasmatische Teil der TLRs zeigt eine hohe Homologie zur IL-1 Rezeptorfamilie, daher wird er als Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne bezeichnet. Die TIR-Domäne des TLR ist die Voraussetzung für die Rekrutierung von Adapterproteinen, die ebenfalls eine TIR-Domäne aufweisen (MyD88, TRIF, TRAM, TIRAP). Durch TIR-TIR-Interaktionen wird die TLR-Signalkaskade initiiert, und weitere Adapterproteine werden zum Proteinkomplex rekrutiert. Je nachdem welcher der zehn TLRs durch seinen Liganden angesprochen wird, unterscheiden sich die nachfolgenden unterschiedlichen Adapterproteine in der Signalkaskade. Zunächst wird zwischen einem MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Weg unterschieden (3, 29).

Beim MyD88-abhängigen Weg löst die Assoziation der TLRs mit MyD88 - direkt oder indirekt über das Adapterprotein TIRAP - die Rekrutierung der Moleküle der IRAK-Familie aus. IRAK-1 wird hyperphosphoryliert und induziert die Interaktion mit TRAF6. Der Komplex aus MyD88, IRAK4, IRAK1 und TRAF6 führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Interferon-aktivierenden Faktoren (IRF3, IRF5 und IRF7) und NF- κ B. Dadurch kommt es zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine.

Beim MyD88-unabhängigen Weg wird anstelle des Adapterproteins MyD88 das Adapterprotein TRIF rekrutiert, beim TRIF-abhängigen TLR4-Signalweg wird zusätzlich das Adapterprotein TRAM benötigt. Die Aktivierung von TRIF führt zur Rekrutierung der

Kinase TBK1, die wiederum IRF3 induziert. Die Assoziation von TRAF6 an das Adapterprotein TRIF - bei TLR3 in Verbindung mit RIP1 - führt zur Aktivierung von NF- κ B. Dabei kommt es zur Bildung von Typ I-IFN. Die Besonderheit des TLR3-Signalweges liegt außerdem in der Induktion zur Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM1, welches durch den TRIF-RIP1-TRAF6-Komplex induziert wird (Abb. 1) (1, 29, 30).

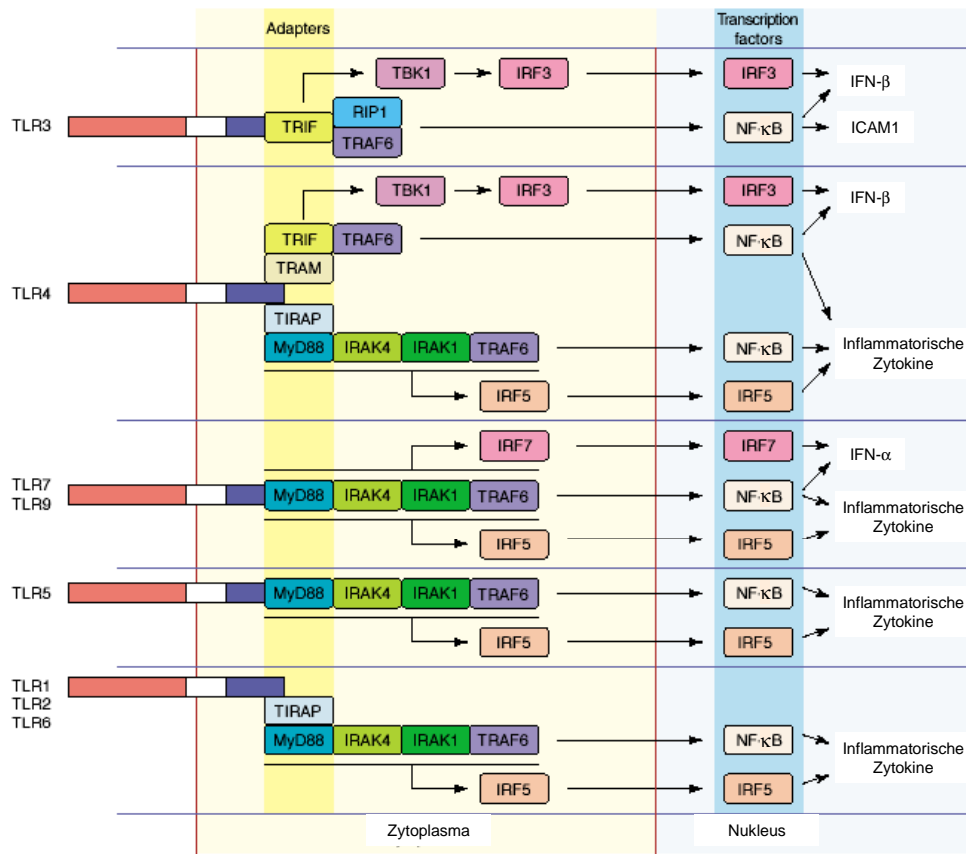


Abb. 1: Schematische Darstellung des TLR-Signalweges. Es werden der MyD88-abhängige und der MyD88-unabhängige Signalweg unterschieden. Beide aktivieren die Transkriptionsfaktoren NF- κ B sowie verschiedene Interferon-regulierende-Faktoren (IRF3, IRF5 und IRF7) und induzieren so die Freisetzung verschiedener Zytokine sowie die Bildung von Adhäsionsmolekülen [MyD88: Myeloide Differenzierungsfaktor 88, TIRAP: Toll/IL-1-Rezeptordomäne enthaltendes Adaptorprotein, IRAK: IL-1-Rezeptorassoziierte Kinase, TRAF: Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor, IRF: IFN-regulierender Faktor, IFN: Interferon, NF- κ B: Nukleärer Faktor- κ B, TRIF: Toll/IL-1-Rezeptordomäne enthaltender IFN- β induzierender Adaptor, TRAM: TRIF-verwandtes Adaptormolekül, TBK: TANK-bindende Kinase, RIP: Rezeptorinteragierendes Protein, ICAM: Intrazelluläres Adhäsionsmolekül] Modifiziert nach (29).

Die ubiquitäre Existenz von LPS/Endotoxin stellt bei Experimenten, die die Signalwege der Entzündungskaskade untersuchen, ein großes Problem dar. Aufgrund der

außerordentlich starken proinflammatorischen Potenz des TLR4-Liganden muss während der Versuche ausgeschlossen werden, dass eine Kontamination der Zellkultur und aller verwendeten Gegenstände und Chemikalien vorliegt. Dies kann durch den Einsatz von Polymyxin B (PmB) bewerkstelligt werden. PmB ist ein Antibiotikum und zeigt seine Wirkung gegen Gram-negative Bakterien, indem es an das Lipid-A irreversibel bindet. Gleichzeitig wirkt es toxisch, indem es die Zellpermeabilität sowohl der Bakterien als auch des Wirtes erhöht (31, 32). Daher ist ein präventiver Einsatz von PmB in den Versuchen nicht möglich. Deshalb müssen, parallel zu den eigentlichen Experimenten (ohne PmB), Kontrollexperimente (mit PmB) durchgeführt werden, die die jeweiligen Ergebnisse verifizieren.

1.2 TLR-Expression auf humanen Zellen

Lange Zeit wurden fast ausschließlich Zellen des natürlichen Immunsystems (vor allem Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen) erfolgreich auf die TLR-Expression hin untersucht, da ihnen die Pathogenerkennung funktionell zugeordnet wurde. Die Vorstellung, dass Gewebezellen an den Mechanismen der Pathogenerkennung mittels konservierter Rezeptorstrukturen beteiligt sein können, gelangte erst seit kurzem in den wissenschaftlichen Fokus. Zunächst wurden hierbei Epithelzellen innerer Organe, z. B. der Atemwege sowie des Darms, untersucht, da sie dauerhaft pathogenexponierte Oberflächen darstellen (2). Mittlerweile werden auch andere Gewebezellen wie Muskelzellen, Leberzellen, Nervenzellen und Gehirnzellen erfolgreich auf die TLR-Expression hin charakterisiert (33-35). Als Zellen des dermalen Gewebes, die nicht den Immunzellen zugeordnet werden, wurden bislang nur Keratinozyten systematisch bezüglich ihrer TLR-Expression untersucht. Als Epithelzellen, die den Organismus räumlich und mechanisch von der mikrobiell belebten Umwelt abgrenzen, kommt ihnen mit der TLR-Expression eine zusätzliche Eigenschaft im Rahmen der natürlichen Immunität zu (36-38).

Interessanterweise wurden Endothelzellen bislang nur in sehr geringem Maße als mögliche Träger von Pathogenerkennungsstrukturen des natürlichen Immunsystems eingestuft. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war nur die Expression des TLR2 und des

TLR4 publiziert (39). Danach folgte die Identifizierung des TLR9 im Jahr 2004 (40), und schließlich wurde dieses Jahr erst die funktionelle Expression des TLR3 bekannt (41).

Aufgrund verschiedener Indizien, die zum einen die Lokalisation im Gewebe und zum anderen die physiologischen Eigenschaften und die Fähigkeiten des Endothels im Rahmen einer Entzündungsreaktion betreffen (42-50), erscheint es aber sinnvoll, Endothelzellen systematisch auf die TLR-Expression hin zu untersuchen, da es nahe liegt, dass den Endothelzellen im Rahmen der Pathogenerkennung und bezogen auf die Beteiligung an den Funktionen des natürlichen Immunsystems, eine besondere Rolle zukommt.

Zur Aufklärung der TLR-Expression wurden in der vorliegenden Arbeit in erster Linie dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) verwendet, die aus Vorhautgewebe isoliert und kommerziell erhältlich sind. Sie sind aufgrund ihrer Lokalisation im Hautgewebe allen hier verwendeten proinflammatorischen Stimuli (Zytokine, UV-Bestrahlung und TLR-Liganden) und Bakterienstrukturen (Pam₃Cys, PGN, Poly(I:C), LPS, Flagellin, Imiquimod und CpG-DNA) direkt oder beim Auftreten kleinster blutender Verletzungen *in vivo* zugänglich. Ferner weisen auch die in Kultur gehaltenen primären Endothelzellen weitestgehend alle bekannten Endothelzeleigenschaften auf, die auch für Endothelzellen in Hautmodellen nachgewiesen werden konnten. Da Untersuchungen mit primären Endothelzellen jedoch zum Teil große Schwierigkeiten (Isolierung reiner Kulturen, anspruchsvolle Kulturbedingungen und sehr begrenzte Lebensdauer in Kultur) aufweisen, wurden in dieser Arbeit zunächst immortalisierte Endothelzellen (HMEC-1) verwendet, die diese Problematik deutlich einschränken und optimale Voraussetzungen für Experimente mitbringen. Um diese zu generieren, haben E. W. Ades *et al.* (1992) humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen mit dem Plasmid PBR-322 inklusive dem Genprodukt *Simian Virus 40 A* stabil transfiziert. Die generierten Endothelzellen HMEC-1 wurden anhand ihrer Morphologie, ihrem Phänotyp und ihrer Funktionalität charakterisiert: "Kopfsteinpflaster"-Muster in der Monolayer-Kultur, Aufnahme acetylierter Low-Density-Lipoproteine, Bildung endothelzellartiger Gefäße in der 3D-Matrix, Expression endothelzelltypischer Oberflächenmoleküle (von Willebrand-Faktor, CD31, CD36, ICAM-1, CD44), Expression des MHC-II-Antigens nach Stimulation mit proinflammatorischem IFN- γ und Lymphozyten-Bindung an den HMEC-1 bei Zelladhäsions-Assays. Hohe Übereinstimmungen der Endothelzellmarker zwischen den

immortalisierten und den primären Endothelzellen weisen darauf hin, dass die generierte Zelllinie HMEC-1 ein gutes Modell für primäre mikrovaskuläre Hautendothelzellen darstellt (51).

1.3 Die Bedeutung des Endothels in der Entzündungsreaktion

Ursprünglich wurde dem Endothel nur eine anatomische Bedeutung zugesprochen, in dem es als homogene, einzellige Endothelzellschicht das Gefäßlumen vom Gewebe trennt. Mit der Zeit haben sich jedoch immer mehr Evidenzen gehäuft, die darauf hinweisen, dass das Endothel eine wichtige Schlüsselfunktion im proinflammatorischen Stoffwechsel einnimmt. Unter physiologischen Bedingungen ist das Endothel antiinflammatorisch sowie antikoagulativ, das heißt, dass die Expression von Adhäsionsmolekülen auf ein Minimum beschränkt ist, wodurch im Organismus ein ungehinderter Blutfluss ermöglicht wird. Durch eine Infektion mit bakteriellen, viralen, fungiziden oder parasitären Erregern kommen Endothelzellen als erster Zelltyp im Körper mit den im Blut zirkulierenden Pathogenen beziehungsweise deren sezernierten Toxinen in Kontakt. Keimbahn-kodierte Rezeptoren auf im Blut zirkulierenden Immunzellen (Neutrophile und Monozyten) und Endothelzellen (für die die TLRs 2, 3, 4 und 9 bereits nachgewiesen sind (39-41)) detektieren die PAMPs. Durch die Liganden/Rezeptor-Bindung wird dann die TLR-Signalkaskade ausgelöst, die über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3/5/7 und NF- κ B zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (z. B. IL-1 β , TNF- α und IFN- γ) und weiterer Entzündungsmediatoren führt (52, 53).

Durch die Sekretion der verschiedenen Entzündungsmediatoren wird das Endothel aktiviert. Die damit verbundene Erhöhung der Gefäßpermeabilität führt zur Exsudation und damit einhergehender Zunahme der Blutviskosität sowie zur Vasodilatation. Durch reduziertes Blutvolumen bei gleichzeitig erhöhtem Querschnitt des betroffenen Blutgefäßes verringert sich die Fließgeschwindigkeit und resultiert in einer veränderten Fließeigenschaft des Blutes (hydrodynamische Margination). Dabei kommen vor allem die mit dem Blutstrom transportierten Leukozyten häufiger und länger in Kontakt mit den das Gefäßlumen auskleidenden Endothelzellen. Auf ihrer Oberfläche sind die sogenannten E-Selektine exprimiert, die zu einer reversiblen Anheftung von Leukozyten

über s-Le^x-Rezeptoren an das Endothel führen ("Leukozyten-Rolling"). In der nächsten Aktivierungsphase werden von den Endothelzellen weitere Oberflächenmoleküle (die Adhäsionsmoleküle ICAM-1/-2, VCAM-1, PECAM) auf den Endothelzellen exprimiert, und zusätzlich wird intra- und extravasal das hauptsächlich von Endothelzellen sezernierte Chemokin Interleukin-8 (IL8/CXCL8) gebildet. Durch Bindung des intravasal freigesetzten IL-8 an entsprechende Rezeptoren der Leukozyten (IL-8 Rezeptor/CXCL8R) werden weitere Rezeptoren der Familie der Integrine wie LFA-1 und CR3 von den Leukozyten exprimiert, und es kommt zu einer starken Interaktion zwischen den Endothelzellen und den Leukozyten. Die Leukozyten beginnen, dem chemotaktischen Gradienten des IL-8 folgend, ihre Wanderung zwischen den Endothelzellen hindurch zum Ort der Entzündung im Gewebe (Diapedese und Transmigration) (49). Die ersten einwandernden Leukozyten sind Granulozyten und Monozyten bzw. Makrophagen, die in der proinflammatorischen Umgebung zu phagozytierenden Granulozyten und Makrophagen reifen und die Erreger bei der Phagozytose durch lysosomale Enzyme abbauen. Unter Mitwirkung der phagozytären NADPH-Oxidase kommt es zum "oxidative burst", dabei entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die sowohl auf Pathogene als auch auf das umliegende Gewebe toxisch wirken (54).

Zeitlich etwas verzögert wird durch die NF- κ B-induzierte Sekretion von Entzündungsmediatoren die induzierbare NO-Synthase (iNOS) aktiviert. Durch die hohen freigesetzten NO-Mengen können in weiteren Reaktionen reaktive Nitroverbindungen (RXNO) gebildet werden, die, ähnlich wie die ROS, toxisch sowohl auf das Pathogen als auch auf den Wirt wirken. Ferner wirkt das NO als starker Vasodilatator auf die Gefäßzellen und reduziert die Expression der Adhäsionsmoleküle (P-Selektin, ICAM-1/-2, VCAM-1, PECAM) durch Hemmung der IL-8-Sekretion und führt dadurch im weiteren Verlauf zur reduzierten Sekretion proinflammatorischer Moleküle und dadurch zur Eindämmung der Entzündungsreaktion nach erfolgter Immunantwort (45-47, 55-60).

Sind die Maßnahmen des natürlichen Immunsystems nicht ausreichend und kann auch das adaptive Immunsystem die Infektion nicht eindämmen, so kann die Entzündung generalisieren, und es kommt zur Sepsis. Diese wird durch das Systemische Inflammatorische Responsive Syndrom (SIRS) angezeigt, wenn es auf einer mikrobiologisch oder klinisch gesicherten Infektion beruht. Als Septischer Schock mit akuten multiplen Organdysfunktionen verläuft die Sepsis oft letal (Abb. 2) (50).

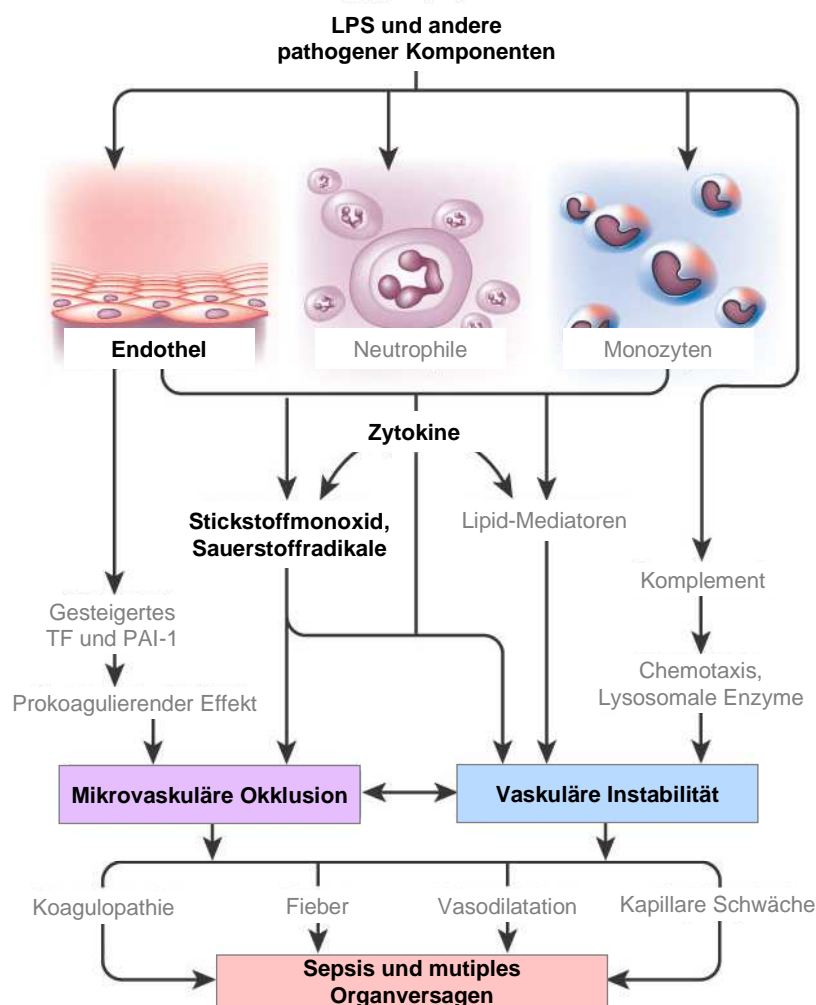


Abb. 2: Netzwerk der Entzündungsreaktion. Pathogene Stimuli aktivieren verschiedene Kaskaden, die zeitlich parallel ablaufen und letztendlich zur ausgeprägten Sepsis mit multiplen Organversagen führen. Im Rahmen dieses Prozesses ist das Endothel, neben Neutrophilen und Monozyten, durch prokoagulierende Effekte, Bildung und Freisetzung von Stickstoffmonoxid und Sauerstoffradikalen, proinflammatorischen Zytokinen und Metaboliten des Arachidonsäure-Stoffwechsels sowie durch Aktivierung der Komplementkaskade involviert. Diese Mechanismen nehmen Einfluss auf die mikrovaskuläre Okklusion und vaskuläre Instabilität, welche aufgrund ihrer Physiologie zur Sepsis mit multiplen Organversagen führen können. Modifiziert nach (50).

1.4 Relevanz des Chemokins Interleukin-8

Interleukin-8 (IL-8/CXCL8) stellt den Prototyp der Chemokine dar. Die konstitutive Expression von IL-8 ist eher gering, kann aber durch Induktion massiv gesteigert werden. Funktionsstudien haben gezeigt, dass IL-8 als Antwort auf proinflammatorische Mediatoren wie Zytokine (vor allem $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$), ROS, Viren und Bakterien in

Endothelzellen gebildet wird. Es ist ein "early-response" Gen, und die mRNA kann bereits 60 Minuten nach Zellstimulierung detektiert werden (42, 60-62).

Die transkriptionelle Expression von IL-8 steht unter der Kontrolle der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, CCAAT/Enhancer-bindendes Protein (C/EBP- β) sowie Aktivatorprotein-1 (AP-1). Durch TNF- α und andere proinflammatorische Zytokine wird der IL-8-Promotor, durch kooperierende Bindung von NF- κ B, C/EBP- β und AP-1 an ein "composite enhanceosome", aktiviert (43, 63, 64). Für die Transkriptionsinduktion von IL-8 reicht bereits die Aktivierung und kooperierende Bindung von NF- κ B an das entsprechende Promotorfragment. Für eine maximale IL-8-Produktion ist jedoch die zusätzliche Unterstützung von C/EBP- β sowie AP-1 an den IL-8-Promotor notwendig.

Die Transkription des IL-8-Gens führt zu einer mRNA mit 1,8 kb. Diese wird in ein 99 Aminosäuren-großes Vorläuferprotein translatiert. Durch N-terminales, extrazelluläres Prozessing, welches die Abspaltung der Signalsequenz beinhaltet, wird das funktionelle Protein gebildet, dessen dominante Form das 8,5 kDa große Protein IL-8 darstellt. Die chemotaktische Wirkung des IL-8 ist besonders stark und langanhaltend.

IL-8 wird von verschiedenen Zelltypen wie Phagozyten und Dendritischen Zellen, aber auch von Gewebe- sowie insbesondere durch Endothelzellen sezerniert. Durch IL-8 aktiviert, findet eine Gradienten-gerichtete Leukozytenwanderung ins Entzündungsgebiet statt ("Leukozyteninfiltration"). Die chemotaktische Wirkung des IL-8 ist essentiell bei der Bekämpfung von Infektionen. Es spielt daher eine besondere Rolle in der Entzündungsreaktion und wurde als Marker für die Sepsis verifiziert. Es besteht eine hohe Korrelation zwischen klinischer Symptomatik und quantitativem IL-8-Nachweis. Erhöhte IL-8-Plasmaspiegel in Sepsispatienten sind assoziiert mit hohen Mortalitätsraten (42, 61, 62).

1.5 Bedeutung der induzierbaren NO-Synthase

Die Familie der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) umfasst drei Isoformen. Zwei der NOS werden konstitutiv exprimiert – die neuronale NOS (nNOS/NOS1) und die endotheliale NOS (eNOS/NOS3). Benannt wurden sie nach den Geweben, aus denen sie zuerst isoliert und kloniert wurden. Die konstitutiven NOS (cNOS) werden posttranskriptionell reguliert, und ihre Induzierbarkeit hängt von der intrazellulären Ca^{2+} -

Konzentration ab. Die von den konstitutiven NOS freigesetzten Mengen an NO sind eher gering und in den Entzündungsprozess meist nicht involviert (45, 65).

Die dritte Isoform der NOS wird als die induzierbare NO-Synthase (iNOS/NOS2) bezeichnet. Der Begriff "induzierbar" bezieht sich *per definitionem* auf die durch proinflammatorische Zytokine induzierbare NOS. Die Induktion kann durch das proinflammatorische Zytokintriplt IL-1 β /TNF- α /IFN- γ erreicht werden. Ferner kann die iNOS durch UV-Strahlung oder LPS aktiviert werden (45). LPS ist bislang auch die einzige Pathogen-assoziierte Struktur, mit der eine Verbindung zwischen TLR- und iNOS-Expression hergestellt werden konnte (66). In ruhenden Zellen wird die iNOS jedoch praktisch nicht exprimiert, jedoch konnte sie nach Induktion, neben vielen anderen Zellen, auch auf humanen Endothelzellen nachgewiesen werden (65, 67, 68).

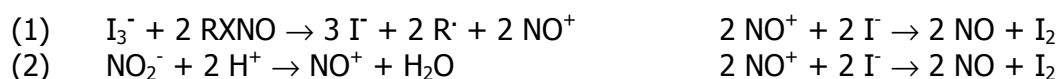
Die Promotorregion der iNOS umfasst 22 mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Durch die Vielfalt der transkriptionellen Bindungsmöglichkeiten kann eine sensible Regulation der iNOS-Genexpression erfolgen, und es sind oftmals verschiedene oxidative Stoffwechselprodukte (ROS), die die Bindung von NF- κ B an die DNA veranlassen. Die genauen Regulationsmechanismen sind jedoch bis heute für die humane iNOS nicht vollständig aufgeklärt (45, 47).

Durch die Aktivität der NOS wird L-Arginin zu Citrullin und NO umgesetzt. Das dabei freiwerdende NO kann dann in weiteren Reaktionen verstoffwechselt werden (45, 47, 69, 70). Unter anderem reagiert NO dabei auch mit Cysteinen verschiedener Transkriptionsfaktoren, wodurch es zu Veränderungen der DNA-Bindungsaktivität kommt. In dieser Arbeit relevante Transkriptionsfaktoren, die nitrosiert werden, sind NF- κ B (nimmt eine zentrale Stellung im TLR-Signalweg ein) und AP-1 (ist bei der Regulierung der IL-8-Produktion involviert). Auf diesem Weg nimmt NO Einfluss auf die Regulation verschiedener Gene, die durch diese Transkriptionsfaktoren moduliert werden (71-73).

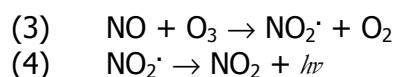
Um NOS-abhängige Reaktionen zu verifizieren, können verschiedene spezifische NOS-Inhibitoren (z. B. L-NIO) verwendet werden. Sie hemmen als Arginin-Analoga die NOS-Aktivitäten durch kompetitive Hemmung. Da die NO-Freisetzung der konstitutiven NOS sehr gering und nur in engen Grenzen modulierbar ist, kann durch Verwendung der NOS-Inhibitoren auf die Beteiligung der iNOS an der jeweiligen Reaktion geschlossen werden (74, 75).

Die hohen Konzentrationen an freigesetztem NO durch die iNOS sowie die daraus gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Nitrosoverbindungen (RXNO) wirken erfolgreich sowohl bei der normalen Wundheilung als auch bei der unspezifischen Immunabwehr gegen Bakterien, Viren und Parasiten. Im Rahmen des septischen Schocks ist die NO-Freisetzung jedoch kurzzeitig so hoch, dass es zur maximalen Vasodilatation, verbunden mit massivem Blutdruckabfall, kommt und zur Schocksymptomatik führen kann (58, 76).

Diese vergleichsweise hohen freigesetzten NO-Mengen beziehungsweise die verschiedenen RXNO können praktisch ausgenutzt werden, indem die Nitrosoverbindungen quantitativ ermittelt werden und dadurch indirekt auf die iNOS-Aktivität auf Proteinebene nach Induktion mit einem bestimmten Stimulus geschlossen werden kann. Durch Behandlung der zu untersuchenden Proben mit Sulfanilamid/H⁺ entsteht aus dem, neben den darin enthaltenen Nitrosoverbindungen, auch enthaltenen Nitrit in saurer Lösung ein stabiles Diazoniumsalz, welches in der Chemilumineszenzdetektion (CLD) nicht mehr zu NO reagieren kann. Die höheren Stickoxide reagieren damit später mit dem in der Reaktion zugesetzten Ozon. Mittels CLD werden die in der Probe enthaltenen NO-Verbindungen durch eine reduzierende Iodid/Trijodid-Lösung aufgespalten.



Dabei wird zunächst NO äquimolar aus Nitrit gebildet, ein konstanter Fluss an Helium erleichtert dabei den Übertritt von NO in die Gasphase. Den entstandenen NO-Proben wird Ozon zugesetzt, welches spezifisch mit NO zu Stickstoffdioxid reagiert. 20 % des NO gehen dabei in einen angeregten Zustand (NO₂[·]) über.



Die Energie des angeregten Zustandes wird dann als Photon abgegeben und kann im Photodetektor quantifiziert werden. Das emittierte Licht ist in einem großen Konzentrationsbereich linear proportional zum NO-Gehalt der Probe. Dadurch kann aus der Gesamt-Probe der Anteil an RXNO bestimmt werden (77, 78).

1.6 UV-Strahlung als Auslöser von Entzündungsreaktionen

Sonnenlicht ist eine essentielle Voraussetzung, die das Leben auf der Erde überhaupt erst ermöglicht. Es setzt sich aus unterschiedlichen Strahlen verschiedener Wellenlängen zusammen: Etwa 48 % sind sichtbares Licht (380 - 780 nm), etwa 45 % sind wärmendes Infrarotlicht (780 - 1000 nm) und ungefähr 7 % sind UVA- (320 - 380 nm), UVB- (280 - 320 nm) und UVC- (100 - 280 nm) Strahlen. Während das Sonnenlicht die Atmosphäre passiert, werden nahezu alle UVC-Strahlen und etwa 90 % der UVB-Strahlung durch Ozon, Wasserdampf, Sauerstoff und Kohlendioxid absorbiert. UVA-Strahlung jedoch dringt annähernd ungehindert bis auf die Erde vor.

Bei einer Eindringtiefe der UVA-Strahlung von bis zu 1 mm und der UVB-Strahlung von etwa 0,5 mm in die Haut erreichen beide Strahlenarten alle Zelltypen der Epidermis sowie der Dermis und damit auch die in der Dermis lokalisierten mikrovaskulären Endothelzellen, deren TLR-Expression unter UV-Bestrahlung charakterisiert werden soll (Abb. 3).

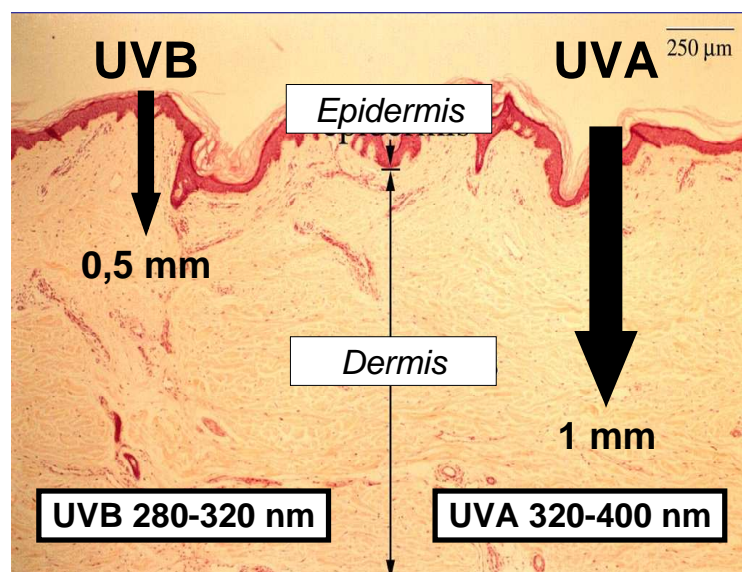


Abb. 3: Eindringtiefe UVA- und UVB-Strahlung. Die Sonnenstrahlen, die bis zur Erde vordringen, enthalten sichtbares Licht, wärmende Infrarotstrahlen sowie UVA- und UVB-Strahlen. Letztere sind für den Menschen nicht sichtbar und dringen tief in die Haut ein. Die langwelligeren UVA-Strahlen dringen bis in die Dermis vor, die kurzwelligeren UVB-Strahlen durchdringen die Epidermis. Dort verursachen die Strahlen beim Überschreiten eines individuellen Schwellenwertes zum Teil schwerwiegende Schäden [Quelle: Christoph Suschek].

Übermäßige UV-Bestrahlung der Haut kann schwerwiegende Folgen, wie Entzündungen ("Sonnenbrand", Erytheme), morphologische Veränderungen der Hautschichten ("Sonnenschwielen"), Ödeme (Gefäßdilataion), vorzeitige Hautalterung ("Photoageing", Zerstörung von Kollagengewebe) sowie Hautkrebs, haben. Diese sichtbaren Veränderungen stellen nur die "Spitze des Eisbergs" dar.

Im molekularen Zusammenhang spielt dabei die UV-bedingte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eine entscheidende Rolle. Zu den ROS gehören freie Radikale [Superoxid-Radikal ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxyl-Radikal (HO^{\cdot}), Peroxyl- ($ROOH^{\cdot}$) und Alkoxyradikal (RO^{\cdot}), Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot})], stabile molekulare Oxidantien [Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Ozon (O_3), Lipidhydroperoxid (LOOH), hypochlorige Säure (OCl^-)] sowie angeregte Sauerstoffmoleküle [Singulett-Sauerstoff (1O_2)]. Diese Strukturen greifen diverse Zellstrukturen (vor allem Zellmembranen durch Lipidperoxidation, Proteine, nukleäre sowie mitochondriale DNA) an und schädigen sie dauerhaft durch Oxidation.

Bis zu einem gewissen Grad besitzt der Körper spezifische Abwehrmöglichkeiten, die ROS eliminieren können. Dazu zählen verschiedene antioxidativ wirksame Enzyme (z. B. Superoxiddismutase/SOD, Glutathionperoxidase/GPX, Katalasen) und nicht-enzymatische Radikalfänger (z. B. Ascorbinsäure, Glutathion, Tocopherole, Carotinoide), die ein physiologisches antioxidatives Netzwerk bilden. Diese Mechanismen sind notwendig, da ROS auch unter physiologischen Bedingungen (z. B. enzymatische Oxidation, aerobe Zellatmung) oder von Immunzellen bei der Bekämpfung von Pathogenen gebildet werden.

Übersteigt die ROS-Bildung einen physiologischen Schwellenwert, wie er z. B. durch UV-Bestrahlung schnell erreicht wird, können die körpereigenen Schutz- und Reparaturmechanismen (Antioxidatives Netzwerk, DNA-Exzisions-Reparatur) nicht mehr ausreichend gegenwirken, und es kommt zur Entzündungsreaktion und damit korrelierenden Zellschäden. Prämutagene DNA-Schäden werden hauptsächlich durch UVB-Strahlung induziert, wobei es vor allem zur Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) sowie Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidin-Photoprodukten kommt. Während früher angenommen wurde, dass UVA nicht oder nur in geringem Maß zellschädigend wirkt, zeigen neuere Erkenntnisse, dass UVA-Strahlung zu nicht-dimerischen DNA-Photoprodukten, wie z. B. oxidativen Basenmutationen, führen kann. Die DNA-Mutationen können, wenn sie von den körpereigenen Mechanismen nicht repariert werden können, zu (Haut-)Krebs führen. Diese Problematik wird dadurch verstärkt, dass

die UV-Strahlung auch negativ auf das Immunsystem Einfluss nimmt. Bereits durch mäßige Exposition kommt es zur lokalen sowie systemischen Immunsuppression. Diese zeichnet sich nach aktueller Literaturlage durch reduzierte Antigenpräsentation von Langerhanszellen, gesteigerte Immuntoleranz für Kontaktgene, missregulierte T-Zell-Aktivität sowie verstärkte Sekretion immunsuppressiver Entzündungsmediatoren aus (79, 80).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Endothel ist aufgrund seiner physiologischen Beschaffenheit sowie seiner lokalen Disposition maßgeblich am Entzündungsprozess beteiligt. Es ist bekannt, dass es als interaktive Barriere zwischen Blut und umliegenden Geweben mit verschiedenen Pathogenen und deren Produkten in Kontakt kommt und dass es in der Lage ist, sowohl bei der zellulären als auch humoralen Immunantwort als Mediator zu fungieren. Bislang wurde dem Endothel als Hauptaufgabe die Aktivierung der Leukozyteninfiltration am Entzündungsort zugeordnet sowie der Endothelzelle die Funktion einer Effektorzelle im laufenden Entzündungsgeschehen.

Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob Endothelzellen durch eigenständige Pathogenerkennung unmittelbar an der Auslösung sowie der Regulierung der Entzündungsreaktion beteiligt sind. Da die pathogen-assoziierte molekulare Mustererkennung hauptsächlich durch Toll-like Rezeptoren (TLRs) erfolgt, sollten humane Endothelzellen bezüglich dieser Rezeptoren charakterisiert werden.

Neben der Frage, welche der zehn bekannten Rezeptoren auf ruhenden Endothelzellen exprimiert werden, sollte die Fähigkeit zur Expressionsmodulation der TLRs im Rahmen einer Entzündungsreaktion unter Zuhilfenahme verschiedener proinflammatorischer Noxen (Zytokine und UV-Strahlung) untersucht werden.

Weiter sollte gezeigt werden, dass TLRs auf Endothelzellen funktionell exprimiert werden und dass sie eine essentielle Aufgabe bei der Initiation und Regulation der Entzündungsreaktion haben. Dabei sollte vor allem die Beteiligung der iNOS (iNOS-Expression und Freisetzung von Nitroverbindungen) untersucht werden. Neben der Behandlung ruhender Endothelzellen sollten auch sich im Entzündungszustand befindliche Endothelzellen differenziert werden, um Aufschluss zu erhalten, inwiefern

sich die initiale Pathogenerkennung durch TLRs in gesundem oder entzündetem Gewebe unterscheidet. Abschließend sollte außerdem geklärt werden, ob eine regulatorische Beziehung zwischen dem von der iNOS während eines Entzündungsprozesses freigesetzten NO und der TLR-Expression, im Sinne eines Feedback-Mechanismus, besteht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gebrauchsmaterialien

2.1.1.1 Geräte

- 5100 Cyro 1 °C Freezing Container (Fa. Nalgene® Labware, Rochester (NY), U. S. A.)
- ABI Prism HT 7900 Real Time PCR System, Gene Amp PCR-System 9700 (Fa. Applied Biosystems, Foster City (CA), U. S. A.)
- Autoklav GLA40 (Fa. Fritz Gössner Medizin und Labortechnik, Hamburg, Deutschland)
- Brutschränke: Heraeus® Hera Cell® (Fa. Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland), Brutschrank IG150 (Fa. Jouan, Saint Nazaire, Frankreich)
- Bunsenbrenner: Flammy L (Fa. Schütt, Göttingen, Deutschland), Fireboy (Fa. Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz)
- CLD 88NO (Fa. Ecophysics, München, Deutschland)
- Digitalkameras: RT-Monochrome und RT-Color inkl. Software Spot Advanced (Fa. Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights (MI), U. S. A.)
- Eppendorf Multipette® 4780 (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- FLUOstar OPTIMA Mikroplatten-Leser (Fa. BMG Labtech, Offenburg, Deutschland)
- Gelkammern für Elektrophoresen (Fa. BioRad®, München, Deutschland)
- Heizplatte Ceran® (Fa. Schott AG, Mainz, Deutschland)
- Magnetrührer REQ Ikamak® (Fa. Ika®-Werke, Staufen, Deutschland)
- Mikroskope: Axiovert200 und Axioplan (Fa. Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- pH-Meter digital (Fa. Knick, Berlin, Deutschland)
- Photometer Ultraspec2000 UV/Visible Spectrometer (Fa. Pharmacia Biotech, Cambridge, U. K.)
- Ultraschall UP50H (Fa. Dr. Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Deutschland)
- Schüttler MS1 Minishake (Fa. Ika®-Werke, Staufen, Deutschland)
- Spannungsgeber für Digitalkameras RT-Powersupply (Fa. Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights (MI), U. S. A.)
- Spannungsgeber für die CLD (Fa. Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH, Berlin, Deutschland)
- Spannungsgeber für Elektrophoresen Power Pac Basic (Fa. Bio-Rad Laboratories, Hercules (CA), U. S. A.)
- Sterilbank EF5EC, Sterilbank Euroflow (Fa. Clean Air Technik B. V., Woerden, Niederlande)
- Thermocycler Gene Amp PCR-System 9700 (Fa. Applied Biosystems, Foster City (CA), U. S. A.)
- UV-Lichtplatte Fluo-unk (254 nm) (Fa. Bachofer, Reutlingen, Deutschland)
- Vortex MS1 Minishake (Fa. Ika®-Werke, Staufen, Deutschland)
- Waagen: Feinwaage AG285, Waage E200 (Fa. Mettler-Toledo International Inc., Greifensee, Schweiz)
- Wasserbad Thermomix® RU (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland)
- Wasserbäder für die CLD: R107 Ecoline Star Edition und O25 Ecoline Star Edition (Fa. Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland)
- Zellkulturpumpe Laboport® (Fa. KNF-Neuberger Inc., Trenton (NJ), U. S. A.)
- Zentrifugen: Allegra™ 6KR (Fa. Beckman Coulter Inc., Fullerton (CA), U. S. A.), Glaxy Mini (Fa. VWR, Batavia (NY), U. S. A.), Eppendorf E5412 und 5415D (Fa. Eppendorf,

Hamburg, Deutschland), Kühlzentrifuge Universal 30RF (Fa. Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)

- UVA Sellas-4000 Lampe (Fa. Sellas Medizinische Geräte, Gevelsberg, Deutschland)
- UVB UV800 (Fa. Waldmann, Villingen-Schwenningen, Deutschland)

2.1.1.2 Glaswaren

- Bechergläser, Glasflaschen, Messzylinder, Erlmeyer-Kolben (Fa. Brand, Wertheim, Deutschland; Fa. Schott-Duran®, Wertheim, Deutschland)
- Neubauer Zählkammer (Fa. Brand, Wertheim, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

2.1.2.1 Chemikalien

- 2-Mercaptoethanol (Fa. Riedel-de Häen, Hannover, Deutschland)
- Aceton, Dimethylsulfoxid, Dinatriumhydrophosphat, Eisessig, Ethanol, Isopropanol, Hämotoxin, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumchlorid, Kaliumiodid, Natriumchlorid, Natriumdihydrogencarbonat, Natriumhydroxid, Natriumnitrit, Salzsäure, Wasserstoffperoxid (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Agarose, Ethylendiamintetraacetat, Iod, Kaliumiodid, Natriumdeoxycholat, Neocuproin, N-Ethylmaleimid, Neutralrot-Lösung, Polymyxin B, Sulfanilamid (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland)
- Albumin aus Rinderserum (Fa. Biomol, Hamburg, Deutschland)
- CpG-DNA, oligo(dT), Randomprimer, Oligonukleotide für die Gene 18S, GAPDH, HPRT, iNOS, TLR (Fa. Sigma-Genosys, Steinheim, Deutschland)
- Ethidiumbromid, Triton X-100 (Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland)
- Eukitt, Natriumdodecylsulfat, Tris, Tris-HCl (Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Größenmarker MWM XIV für Agarosegele (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
- Imiquimod (Fa. Sequoia Research Products Ltd., Pangbourne, U. K.)
- LAL Reagent Water (Fa. Cambrex BioScience, Walkersville (MD), U. S. A.)
- L-N-(Iminoethyl)-ornithin-dihydrochlorid (L-NIO) (Fa. Alexis, Grünberg, Deutschland)
- LPS (E. coli O55:B5) (Fa. Sigma, Saint Louis (MO), U. S. A.)
- Nonidet P-40, Phosphorsäure, Schwefelsäure (Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland)
- Pam₃Cys, Peptidoglycan (*S. aureus*), Poly(I:C), Flagellin (*B. subtilis*), LTA (*S. aureus*) (Fa. Invivogen, San Diego, U. S. A.)
- polyklonaler anti-maus TLR4 (L-14)-Antikörper, polyklonaler anti-human TLR7 (V20)-Antikörper (Fa. Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (CA), U. S. A.)
- rekombinantes humanes Interleukin-1 β , humaner Tumornekrosefaktor- α , humanes Interferon- γ (Fa. Strathmann Biotec, Hannover, Deutschland)
- RNase Inhibitor (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Thermoklar® (Fa. BioMed, München, Deutschland)
- Wasser/molekularbiologischer Grad (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Xylolersatz (Fa. Sakura Finetec Inc., Torrance (CA), U. S. A.)

2.1.2.2 Plastikartikel

- 96-Well Optical Reaction Plate with barcode 128 ABI Prism, Optical Adhesive Covers (Fa. Applied Biosystems, Foster City (CA), U. S. A.)
- 96-Well-Platten F96 MaxiSorp Nunc-ImmunoPlates, Glas Chamber Slide 2-Well (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark)
- 96-Well-Platten PS-Microplate 96K, Gewebekulturschalen 6-Well/6 cm/10 cm, PP-Röhrchen 15 ml/50 ml (Fa. Greiner Bio-One, Essen, Deutschland)
- Absaugpipetten 5 ml (Fa. BD Falcon, Heidelberg, Deutschland)
- Cell-Lifter Costar® (Fa. Corning Inc., Corning (NY), U. S. A.)
- Einweg Zellschaber (Fa. BD Falcon, Heidelberg, Deutschland)
- Injektionsnadel 20 G x 1 1/2 (Fa. Terumo, Leuven, Belgien)
- Parafilm® (American National Can™, Chicago (IL), U. S. A.)
- pH-Indikatorstreifen nicht-blutend pH 0 - 14 (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Pipetten Costar® 5 ml/10 ml/25 ml (Fa. Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande)
- Pipetten-Spitzen DNase RNase frei 10 µl (Fa. Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- Pipetten-Spitzen TipOne® 10 µl/200 µl/1000 µl (Fa. StarLab GmbH, Ahrensberg, Deutschland)
- Präzisions-Dispenser-Tips 1,25 ml/2,5 ml/5 ml (Fa. Brand, Wertheim, Deutschland), 0,5 ml, Reaktionsgefäße Save Lock Tubes 0,5 ml/1,5 ml/2 ml (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Spritzen: Omnifix® F Luer 1 ml, Injekt 10 ml Luer Solo, Omnifix® 50 ml (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland)
- Sterilfilter Minisart® 0,20 µm (Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland)

2.1.3 Kits

- DC Protein Assay (Fa. BioRad®, München, Deutschland)
- DuoSet® ELISA Development System, H₂O₂/Tetramethylmenzidin-Substratlösung (Fa. R&D Systems, Minneapolis, U. S. A.)
- OmniScript RT Kit, QIAshredder, QuantiTect SYBR Green PCR Kit, RNase-Free DNase Set, RNeasy Mini Kit, Taq PCR Core Kit (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Power SYBR Green PCR Master Mix (Fa. Applied Biosystems, Foster City (CA), U. S. A.)
- Universal LSAB™₂ Kit, DAKO® Liquid DAB Substrate-Chromogen System (Fa. DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland)
- VenorGeM® Mycoplasma Detection Kit (Fa. Minerva Biolabs GmbH, Wuhlheide, Deutschland)

2.1.4 Zellen, Zellkulturmedien und Zusätze

- Primäre humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) (Fa. PromoCell, Heidelberg, Deutschland)
- Immortalisierte humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1) (Center of Disease Control and Prevention, Atlanta (GA), U. S. A.)
- Endothel Cell Growth Medium MV, ECGS/H, FCS (für HDMEC), EGF, Hydrocortison, Amphotericin B, Gentamycin (Fa. PromoCell, Heidelberg, Deutschland)

- FCS (zum Abstoppen und für HMEC-1), Penicillin/Streptomycin, RPMI 1640 Medium ohne L-Glutamine, 1% Trypsin/0,3 % EDTA (Fa. PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)
- GlutaMAX™, MCDB 131 Medium (Fa. GIBCO® invitrogen cell culture, Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

ECGM-MV [⊕]	Endothelial Cell Growth Medium MV + ECGS/H + FCS + EGF + Hydrocortison + Amphotericin B + Gentamycin	0,4 % 5 % 10 ng/ml 1 µg/ml 50 ng/ml 50 µg/ml
RPMI [⊕]	RPMI 1640 + FCS + Penicillin/Streptomycin	10 % 60 U/ml
RPMI ^{⊕⊕}	RPMI 1640 + FCS + Penicillin/Streptomycin	20 % 60 U/ml
MCDB/AG	MCDB 131 + FCS + Glutamax I + Amphotericin B + Gentamycin	10 % 1 x 50 ng/ml 50 µg/ml

Tab. 2: Zellkulturmedien. Zusammensetzung der verschiedenen in der Arbeit verwendeten Zellkulturmedien.

2.1.5 Lösungen und Puffer

PBS (pH 7,4)	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄ x2 H ₂ O	8,1 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
TBS (pH 7,8)	Tris	20 mM
	NaCl	150 mM
Nicht-reduzierender Lysispuffer (pH 7,4)	Tris-HCl	50 mM
	NaCl	300 mM
	EDTA	5 mM
	Neocuproine	0,1 mM
	Triton X-100	1 %
	NEM	10 mM
Iodid-Triiodid- Reduktionslösung (in 93 %-igem Eisessig)	Iod	142 mM
	Kaliumiodid	135 mM
RIPA-Puffer (pH 7,4) (in PBS)	NP40	1 %
	Natrium Deoxychololat	0,5 %
	SDS	0,1 %

Tab. 3: Puffer. Zusammensetzung der verschiedenen in der Arbeit verwendeten Puffer.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultur primärer dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten primären humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC), isoliert aus Vorhaut, stammten von drei verschiedenen Donoren (1x 4 Jahre, 2x 7 Jahre) kaukasischen Hauttyps. Die Zellen wurden in Endothelial Cell Growth Medium MV, supplementiert mit 0,4 % ECGS/H, 5 % FCS, 10 ng/ml EGF, 1 µg/ml Hydrocortison, 50 ng/ml Amphotericin B und 50 µg/ml Gentamicin (ECGM-MV[®]), bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Zur Subkultivierung wurden die Zellen im proliferierenden Stadium und einer Konfluenz von 80 - 90 % mit PBS/0,02 % EDTA gewaschen und mit 1 % Trypsin/0,3 % EDTA versetzt. Da primäre EC sehr empfindlich auf die Trypsin/EDTA-Behandlung reagieren, erfolgte das Ablösen der Zellen bei RT und unter lichtmikroskopischer Beobachtung. Die Trypsinierungsreaktion wurde durch Zugabe von RPMI/20 % FCS/60 U/ml Penicillin/Streptomycin (RPMI[®]) abgestoppt. Nach Zentrifugation der Zellen (5 Min., 1000 rpm) wurde das Pellet in frischem ECGM-MV[®] resuspendiert und die Zellen in einer Dichte von 7.500 Zellen/cm² in 10 cm-Zellkulturschalen (weitere Subkultivierung) oder 6-Well-Platten (Versuche) ausgesät. Für die Versuche wurden Zellen zwischen der 4. und 6. Passage verwendet.

2.2.2 Kultur immortalisierter mikrovaskulärer Endothelzellen

Die immortalisierte mikrovaskuläre Endothelzelllinie HMEC-1 stammt aus dem *Center of Disease Control and Prevention*. Die Kultivierung erfolgte in dem Medium MCDB 131, supplementiert mit 10 % FCS, 1x Glutamax[™], 50 ng/ml Amphotericin B und 50 µg/ml Gentamicin (MCDB/AG) bei 37 °C und 5 % CO₂.

Zur Subkultivierung wurden die Zellen im proliferierenden Stadium und einer Konfluenz von 80 - 90 % mit PBS/0,02 % EDTA gewaschen und mit 1 % Trypsin/0,3 % EDTA versetzt. Zunächst wurde der Ansatz für 3 Min. bei 37 °C/5% CO₂ inkubiert. Das weitere Ablösen der Zellen erfolgte unter lichtmikroskopischer Beobachtung bei RT. Die Trypsinierungsreaktion wurde durch Zugabe von RPMI/10 % FCS/60 U/ml Penicillin/Streptomycin (RPMI[®]) abgestoppt. Nach Zentrifugation der Zellen (7 Min., 1500 rpm) wurde das Pellet in frischem MCDB/AG resuspendiert und die Zellen in einer Dichte von 55.000 Zellen/cm² in 10 cm-Zellkulturschalen (weitere Subkultivierung) oder 6-Well-Platten (Versuche) ausgesät. Für die Versuche wurden Zellen der Passagen 20 - 30 verwendet.

2.2.3 Mycoplasmen-PCR

Infektionen mit Mykoplasmen-Bakterien sind ein immerwährendes Problem in der Zellkultur, da sie durch verschiedene TLRs detektiert werden (81-83). Außerdem kommt es durch Mykoplasmen-Kontaminationen, interessanterweise speziesabhängig (Maus, Mensch), zu Veränderungen der iNOS-Expression. Daher muss besonders bei Versuchen, die die TLR-Expression und deren Signalwege, aber auch NO-medierte Vorgänge oder Entzündungsreaktionen untersuchen, auf Mykoplasmen-Infektionen der Zellkultur geachtet und Kontaminationen ausgeschlossen werden (84, 85).

Dazu werden in ca. 4-wöchigen Abständen die Überstände konfluenten Zellkulturen in der Mycoplasmen-PCR auf Bakterienbefall überprüft. Dazu wird das VenorGeM® Mycoplasma Detection Kit verwendet und die PCR nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.4 Einfrieren von Zellen

Zum Lagern der Zellen für einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten wurden sowohl die primären als auch die immortalisierten Endothelzellen und die Hybridomzelllinie während des Proliferationsstadiums, zunächst wie in 2.2.1 - 2.2.2 beschrieben, trypsinisiert. Das Zellpellet wurde in 4 °C kaltem FCS (750 µl pro 10 cm-Zellkulturschalen) resuspendiert und die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1 : 2 mit 4 °C kaltem Einfriermedium (20 % DMSO in RPMI®) vermischt. Die Zellen je einer Platte wurden in je ein Kryoröhrchen verbracht. Das Einfrieren der Zellen erfolgte im 5100 Cyro 1 °C Freezing Container, in der das Gefriergut schonend (1 °C pro Min.) auf - 80 °C abgekühlt wird. Nach 24 Std. wurden die Kryoröhrchen in Pappkartons eingelagert und bei - 80 °C gehalten.

Die Behandlung der Zellen mit DMSO sowie das Verbringen auf - 80 °C sollte zügig erfolgen, da die Anwesenheit von DMSO die Toxizität chemischer Substanzen erhöht sowie in höheren Dosen bei RT selbst zytotoxisch ist. Durch Verlangsamung des Zellstoffwechsels bei geringen Temperaturen wird dieser Effekt vermindert.

2.2.5 Auftauen von Zellen

Um die Zytotoxizität von DMSO im Einfriermedium so gering wie möglich zu halten, wurden die Kryoröhrchen zügig im Wasserbad bei 37 °C angetaut und die Zellen in 10 ml 4 °C kaltem Medium (HDMEC: ECGM-MV®; HMEC-1: MCDB/AG) gewaschen. Die Zellsuspension wurde für 5 Min. bei 4 °C und 1000 rpm (HDMEC) bzw. 7 Min. und 1500 rpm (HMEC-1) zentrifugiert und das Pellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden auf 10 cm-Zellkulturschalen (Inhalt eines Kryoröhrchens pro Schale) ausgesät und anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.6 Aktivierung der Zellen mit Zytokinen

Für die proinflammatorische Aktivierung der Zellen wurde das Zytokintriplt, bestehend aus rekombinantem humanen IL-1β/humanem TNF-α/humanem IFN-γ mit je 1000 U/ml, verwendet. Die Inkubation mit den Zytokinen erfolgte je nach Versuchsaufbau für 18 oder 24 Std.

2.2.7 Verwendung des NOS-Inhibitors L-NIO

L-N-(Iminoethyl)-ornithin-dihydrochlorid (L-NIO) inhibiert die NO-Synthasen durch kompetitive Hemmung. L-NIO wurde in der Konzentration von 500 µM in den Zellkulturversuchen eingesetzt.

2.2.8 Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht

Die Zellen werden entweder mit UVA- oder UVB-Strahlung behandelt. Zur Einhaltung der korrekten Bestrahlungsdosis wird vor jeder Versuchsreihe die Strahlenintensität mittels

UVA- bzw. UVB-Detektor verifiziert und die benötigte UV-Dosis über die Bestrahlungszeit angepasst. Als UVA-Quelle wird eine Sellas-4000 Lampe verwendet, die ein UVA-Spektrum von 340 - 400 nm emittiert. Als UVB-Quelle dient eine UV-800 Einheit mit einem Spektrum von 280 - 320 nm. Die Zellen werden in 6-Well oder in Glas Chamber Slides 2-Well kultiviert und in PBS für die entsprechende Zeit im Dunklen bestrahlt. Die Lüftung des UVA-Gerätes ist dabei auf Stufe "1" eingestellt, um eine Erwärmung zu vermeiden.

2.2.9 Vitalitätsassay

Zur Bestimmung der relativen Zellzahl nach Toxizitätsversuchen wird der Vitalitätsassay durchgeführt. Die Zellen werden dabei mit einer 0,03 %-igen Lösung des Vitalfarbstoffs Neutralrot (2-Amino-3-methyl-7-dimethyl-amino-phenazoniumchlorid) behandelt und für 60 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. Danach werden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen und anschließend im Dunklen luftgetrocknet. Durch Lyse der Zellen mit 1 % HCl in Isopropanol wird der von den Zellen verstoffwechselte Farbstoff frei und die Extinktion kann im Mikroplatten-Lesegerät bei 530 nm gemessen werden und weist eine lineare Korrelation mit der Zellzahl auf.

2.2.10 Inkubation der Zellen mit TLR-spezifischen Liganden

Vor der Inkubation mit den verschiedenen TLR-Liganden wurden die Zellen jeweils mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit den Liganden erfolgte je nach Versuchsaufbau für 6, 24 bzw. 48 Std. bei 37 °C und 5 % CO₂.

Die Liganden werden alle in Endotoxin-freien Lösungsmitteln aufgenommen. Die Verdünnung auf die Zielkonzentration erfolgt im jeweiligen Zellkulturmedium. Es erfolgte eine Überprüfung des pH-Wertes mittels pH-Indikatorstreifen. Der pH-Wert des mit Liganden supplementierten Mediums wurde, wenn notwendig, auf den pH-Wert des Mediums korrigiert.

2.2.10.1 Pam₃Cys

Lyophilisiertes Pam₃Cys wird in H₂O gelöst (1 mg/ml). Vollständige Solubilisierung wird nach 30 Minuten Mischen erreicht. Die Aliquots sind nach dem Einfrieren (- 20 °C) für mehr als 6 Monate haltbar und wurden für die Versuche maximal 2-mal aufgetaut. Die Zielkonzentration ist 5 µg/ml.

2.2.10.2 Lipoteichonsäure

LTA von *S. aureus* wurde in H₂O gelöst (1 mg/ml). Aliquots sind, entgegen der Herstellerangaben, sowohl bei RT als auch bei - 20 °C kürzer als 1 Monat haltbar. Eingefrorene Aliquots wurden maximal 1-mal aufgetaut. LTA wurde für die Versuche mit einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt.

2.2.10.3 Peptidoglycan

PGN von *S. aureus* wurde mit H₂O auf eine Stammlösungskonzentration von 500 µg/ml gebracht. Die Aliquots wurden nach dem Einfrieren (- 20 °C) maximal 1-mal aufgetaut. PGN wurde in den Versuchen in Konzentrationen von 25 µg/ml eingesetzt.

2.2.10.4 Poly(I:C)

Lyophilisiertes Poly(I:C) wurde mit physiologischer Kochsalzlösung (2,5 mg/ml) versetzt und auf 50 °C erhitzt. Nach kurzem Mischen wurde die Lösung bei RT abgekühlt, um den Annealing-Prozess zu sichern. Aliquots wurden bei - 20 °C gelagert, waren länger als 1 Jahr haltbar und wurden maximal 2-mal aufgetaut. Poly(I:C) wurde in den Versuchen mit 50 µg/ml verwendet.

2.2.10.5 Lipopolysaccharid

Aus LPS (*Escherichia coli* O55:B5, Stammlösung 10 mg/ml, Lagerung bei 4 °C) wurde zunächst eine Vorverdünnung (1:50) in H₂O hergestellt. Da LPS zur Mizellenbildung neigt, die den Endotoxin-Anteil des LPS isoliert, wurde die Vorverdünnung zeitnah zum Versuch 3 x 10 Sek. mit Ultraschall behandelt. Die Lösung wurde dabei auf Eis gekühlt. Die Zielkonzentration war 10 bzw. 100 ng/ml.

2.2.10.6 Flagellin

Flagellin von *B. subtilis* wurde in H₂O gelöst (100 µg/ml). Resuspendiertes Flagellin ist bei - 20 °C knapp 1 Monat haltbar. Aliquots wurden maximal 1-mal aufgetaut. Es wurde mit einer Konzentration von 500 ng/ml im Versuch eingesetzt.

2.2.10.7 Imiquimod

Imiquimod [(1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo[4,5-C]quinolin-4-amin)] (Lagerung bei 4 °C) wurde in Phosphorsäure (pH 4,5) gelöst. Die Stammlösung (2,08 mM) wurde auf 10 µM für die Versuche verdünnt.

2.2.10.8 CpG-DNA

Lyophilisierte CpG-DNA vom Typ A (5'-ggTGCATCGATGCAGggggG-3'; Die Nukleotidsequenz ist eine Chimäre aus Phosphodiestern und Phosphothioaten (86)) wurde in H₂O gelöst (Stammlösungen von 100 oder 1000 µM). Eingefrorene CpG-DNA (- 20 °C) wurden maximal 2-mal aufgetaut. Die Zielkonzentrationen lagen zwischen 0,1 - 10 µM.

2.2.11 Nachweis der Abwesenheit von Endotoxin in den TLR-spezifischen Liganden

Die Liganden wurden mit Polymyxin B Sulfat (PmB) in wässrigen Lösungen für 1 Std. bei 4 °C als Stocklösungen vorinkubiert. Die Verdünnung mit Zellkulturmedium erfolgte zeitnah am Versuch. Die Endkonzentration im Medium betrug für PmB 0,1 - 30 µg/ml. Die Endkonzentration der Liganden im Medium entsprachen den oben genannten Zielkonzentrationen (2.2.10.1 – 2.2.10.8).

Ruhende HMEC-1 wurden für 6 Std. mit den PmB/Liganden/Medium-Ansätzen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Überstände wurden im IL-8 Sandwich-ELISA eingesetzt (2.2.12).

2.2.12 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der IL-8 Sandwich-ELISA wurde mit dem DuoSet[®] ELISA Development System durchgeführt. Der ELISA erfolgte in Maxisorb Immunoplaten nach den Herstelleranweisungen des DuoSet[®] ELISA-Kits. Vom Protokoll abweichend wurde die Reaktion der H₂O₂/Tetramethylbenzidin-Substratlösung bereits nach 5 Min. mit 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Die optische Farbdichte wurde im Mikroplatten-Lesegerät bei 450 nm gemessen.

Als Proben wurden die Zellkulturüberstände aus den Versuchen a) Nicht-aktivierte/aktivierte HDMEC ohne/mit TLR-Liganden und b) Nicht-aktivierte/aktivierte HMEC-1 ohne/mit TLR-Liganden ohne/mit PmB verwendet. Die Verdünnungen wurden bei der Normierung auf Gesamtprotein herausgerechnet (Tab. 4).

a)		Nicht-aktiviert	Aktiviert	TLR-Liganden	PmB	Verdünnung
	HDMEC	√				1:10
		√		√		1:10
			√			1:10
			√	√		1:10

b)		Nicht-aktiviert	Aktiviert	TLR-Liganden	PmB	Verdünnung
	HMEC-1	√				pur
		√		√		pur
			√			1:50
			√	√		1:50
		√		√	√	pur

Tab. 4: Verdünnungen der Zellkulturüberstände für den IL-8 Sandwich-ELISA. a) Nicht-aktivierte/aktivierte HDMEC ohne/mit TLR-Liganden und b) Nicht-aktivierte/aktivierte HMEC-1 ohne/mit TLR-Liganden ohne/mit PmB.

2.2.13 Chemilumineszenzdetektion

Die Bestimmung von Nitrosoverbindungen (RXNO) erfolgte mittels Chemilumineszenzdetektion (CLD) (77, 78) durch Quantifizierung des in der Reaktion freierwerdenden NO.

Nach dem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Zellyse mit nicht-reduzierendem Puffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1 mM Neocuproine, 1 % Triton X-100, 10 mM NEM) und Anwendung von Ultraschall (3 x 10 Sek.). Danach wurden die Proben mit 0,5-%igem Sulfanilamid/1 M HCl behandelt (30 Min., RT), um in den Proben enthaltenes Nitrit zu entfernen. Durch die Reaktion des Nitrit mit Sulfanilamid werden im sauren Milieu stabile Diazonium-Ionen gebildet, die kein NO mehr freisetzen können. Daher ist eine selektive Bestimmung der RXNO in den Proben möglich. Vor und nach der

Sulfanilamid-Behandlung müssen die Proben zur Vermeidung photo- und thermolytischer Spaltungen der RXNO im Dunkeln und auf Eis gehalten werden.

Für die Messung wurden je 300 µl der jeweiligen Probe in die Reaktionskammer injiziert, die mit einer Iodid/Triiodid-Reduktionslösung (266 mg Iod, 756 mg Kaliumiodid, in 7,4 ml H₂O_{bidest.} lösen und anschließend mit 100 ml Eisessig verdünnen) gefüllt ist. Das aus den RXNO freigesetzte NO wurde in der CLD gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand der ermittelten Fläche unterhalb des gemessenen Peaks. Die Normierung der Proben erfolgte anhand einer Nitrit-Standardreihe (0 - 200 nM in 0,9-%iger NaCl-Lösung).

2.2.14 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen erfolgten mit dem *DC* Protein Assay. Das Kit ist ein modifizierter Lowry-Assay (87). Die Proteinbestimmung ist zeitoptimiert und erlaubt die Anwesenheit von Detergenzien in den Proben. Die photometrische Messung erfolgte mit dem Mikroplatten-Lesegerät.

Um die beim ELISA gemessenen IL-8 Konzentrationen in den Zellkulturüberständen auf Protein normieren zu können, wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit RIPA-Puffer (1 % NP40; 0,5 % Sodium Deoxycholat; 0,1 % SDS in PBS) lysiert. Aliquots der Lysate, die bei der CLD gemessen wurden, wurden ebenfalls für die Normierung der Nitrat- und RXNO-Werte einer Proteinbestimmung unterzogen. Die Lysate wurden jeweils bei - 80 °C bis zur Proteinbestimmung gelagert.

2.2.15 Isolierung und Quantifizierung von RNA

Die Isolierung der RNA aus EC erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben. Proben, die in der real-time PCR Verwendung fanden, wurden zusätzlich mit dem RNase-free DNase Set behandelt, da die Primer hier keine Exon-Exon-Grenzen des Gens einschließen.

Zur Quantifizierung der Nukleotide wurden die Absorption der Proben im Photometer bestimmt. Die Absorption von 1 OD bei 260 nm entspricht dabei 40 µg/ml für RNA. Der Quotient aus Nukleinabsorption ($A_{260 \text{ nm}}$) und Proteinabsorption ($A_{280 \text{ nm}}$) gibt dabei den Grad der Proteinverunreinigung der Proben an und sollte zwischen 1,7 und 2 liegen.

2.2.16 Reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurde das OmniScript RT Kit verwendet und entsprechend der nachfolgenden PCR (konventionell oder real-time) modifiziert (Tab. 5).

	Endkonzentrationen	
	konventionelle PCR	real-time PCR
RNA	1 µg	1 µg
10x RT-Puffer	1x	1x
dNTPs [5 mM pro dNTP]	0,5 mM	0,5 mM
oligo(dT)s [20 µM]	1 µM	1 µM
Random Primer [100 µM]	-	10 µM
RNase Inhibitor [40 U/µl]	0,5 U	0,5 U
RTase [4 U/µl]	0,05 U	0,05 U
	ad 20 µl H ₂ O	ad 20 µl H ₂ O

Tab. 5: Pipettierschema für die Reaktion der reversen Transkription. Die Angaben sind für einen Reaktionsansatz.

Die Proben wurden im Thermocycler GeneAmp PCR-System 9700 für 1 Std. bei 37 °C inkubiert und anschließend auf 95 °C erhitzt, um die reverse Transkription durch denaturierte Enzyme zu stoppen. Anschließend wurden die Ansätze auf 4 °C abgekühlt und entweder direkt in der PCR eingesetzt oder bei - 20 °C zwischengelagert.

2.2.17 Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR wurde mit dem Taq PCR Core Kit nach Herstellerangaben durchgeführt (Tab. 6). Die Durchführung erfolgte im Thermocycler GeneAmp PCR System 9700.

	Endkonzentration
cDNA	0,005 µg
10x PCR-Puffer	1x
dNTPs [10 mM pro dNTP]	0,2 mM
Primer sense [20 pM]	0,4 pM
Primer antisense [20 pM]	0,4 pM
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,025 U
	ad 50 µl H ₂ O

Tab. 6: Pipettierschema für die Reaktion der konventionellen PCR. Die Angaben entsprechen einem Reaktionsansatz.

Zur Quantifizierung der Genexpression wurden für die jeweiligen Gene diejenigen Zyklusanzahlen bestimmt, bei der die PCR exponentiell, d. h. im linearen Bereich verläuft. Zur Normierung des untersuchten Gens wurde *GAPDH* oder *HPRT* als "Housekeeping-Gen" herangezogen. Die Oligonukleotid-Sequenzen, die optimalen PCR-Bedingungen sowie die entsprechenden Fragmentgrößen für die jeweiligen Gene wurden wie angegeben gewählt (Tab. 7).

Gen	Accession-Nummer	Oligonukleotid-Sequenzen, PCR-Bedingungen	Fragmentgröße
<i>iNOS</i>	AF068236	sense-5'-ATG CCA GAT GGC AGC ATC AGA-3'; antisense-5'-TTT CCA GGC CCA TTC TCC TGC-3' Protokoll: 94 °C/15 Sek., 60 °C/30 Sek., 72 °C/30 Sek.; 34 Zyklen	379 bp
<i>GAPDH</i>	NM_002046	sense-5'-CAA CTA CAT GGT TTA CAT GTT CC-3'; antisense-5'-GGA CTG TGG TCA TGA GTC CT-3' Protokoll: 94 °C/15 Sek., 57 °C/30 Sek., 72 °C/30 Sek.; 17 Zyklen	416 bp
<i>TLR2</i>	NM_003264	sense-5'-CTG GTA GTT GTG GGT TGA AGC A-3'; antisense-5'-CTA GGG TTT TGT AAG GAT TTC CCA-3' Protokoll: 94 °C/20 Sek., 62 °C/30 Sek., 72 °C/30 Sek.; 34 Zyklen (ruhende HDMEC), 28 Zyklen (aktivierte HDMEC)	446 bp
<i>TLR4</i>	U88880	sense-5'-ATC CAG GTG TGA AAT CCA GAC AA-3'; antisense-5'-GTC AGC TTA TGA AGC CTA ATT TCT-3' Protokoll: 94 °C/20 Sek., 61 °C/30 Sek., 72 °C/30 Sek.; 25 Zyklen (ruhende HDMEC), 24 Zyklen (aktivierte HDMEC)	440 bp
<i>HPRT</i>	BC004686	sense-5'-GCA GTC CCA GCG TCG TGA T-3'; antisense-5'-CTT AGG CTT TGT ATT TGG CTT TTC-3' Protokoll: 94 °C/20 Sek., 57 °C/30 Sek., 72 °C/30 Sek.; 25 Zyklen	685 bp

Tab. 7: Accession-Nummer, Oligonukleotid-Sequenzen, PCR-Bedingungen und Fragmentgrößen der in der Arbeit verwendeten Gene.

Die Proben wurden im 1,8 %igen Agarose/EtBr-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (180 V, 4 °C, 30 Min.). Unter UV-Licht wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht und digital aufgenommen. Die densitometrische Auswertung der DNA-Banden erfolgte mittels KODAK Digital Science 1D Image Analysis Software.

2.2.18 Real-time PCR

Die quantitative real-time PCR erfolgte bei den *TLRs* und der *iNOS* (HDEMC) mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit sowie bei den *TLRs* und der *iNOS* (HMEC-1) mit dem Power SYBR Green PCR Master Mix im ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Tab. 7). "Housekeeping"-Gene ist in allen Fällen *18S*. Das Pipettierschema ist für beide Kits identisch, ebenso gilt das PCR-Programm (1x 95 °C/15 Min. und 40x 95 °C/15 Sek., 60 °C/30 Sek., 72 °C/30 Sek.) für alle Kits bzw. Zelltypen (Tab. 8). Die Proben werden als Tripletts gemessen.

Um den Schwellenwert zu ermitteln, bei dem die PCR-Reaktion für alle untersuchten Gene im linearen Bereich abläuft, wurde für jedes Gen die geeignete Templatemenge zunächst in Vorversuchen ermittelt.

	Endkonzentrationen	
	TLRs 1 – 10, iNOS	18S
cDNA	Zelltyp- und genabhängig	Zelltypabhängig
SYBR Green Master Mix [2x]	1x	1x
Primer sense [10 µM]	300 nM	100 nM
Primer antisense [10 µM]	300 nM	100 nM
	ad 25 µl H ₂ O	ad 25 µl H ₂ O

Tab. 8: Pipettierschema für die Reaktion der Real-time PCR. Die Angaben entsprechen einer Reaktion.

Die in der Real-time PCR eingesetzten cDNA-Konzentrationen sind für HDMEC pro Ansatz:

- 4 ng: *TLR2, TLR4*
- 100 ng: *TLR1, TLR3, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10*
- 1 ng: *18S*

Die in der Real-time PCR eingesetzten cDNA-Konzentrationen sind für HMEC-1 pro Ansatz:

- 4 ng: *TLR4*
- 20ng: *TLR1*
- 100 ng: *TLR2, TLR3, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, iNOS*
- 0,2 ng: *18S*

Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen stammen aus Veröffentlichungen (*18S* (88), *TLRs 1 – 8* (89), *TLR9* (27), *TLR10* (90)) oder wurden mittels der Software Primer Express 2.0 (*TLR7/HMEC-1, iNOS*) (Fa. Applied Biosystems) generiert. Synthetisiert wurden die Primer von Sigma-Genosys. Die Spezifität der Oligonukleotide wurde mit Hilfe des Homologievergleichs von BLAST (NCBI) sowie der Aufzeichnung der Dissoziationskurven überprüft (Tab. 9).

Gene	Acc. No.	Primer	Size of Fragment (in bp)
<i>TLR1</i>	NM_003263	sense: 5'-CAG TGT CTG GTA CAC GCA TGG T-3', antisense: 5'-TTT CAA AAA CCG TGT CTG TTA AGA GA-3'	105
<i>TLR2</i>	NM_003264	sense: 5'-GGC CAG CAA ATT ACC TGT GTG-3', antisense: 5'-AGG CGG ACA TCC TGA ACC T-3'	67
<i>TLR3</i>	NM_003265	sense: 5'-CCT GGT TTG TTA ATT GGA TTA ACG A-3', antisense: 5'-TGA GGT GGA GTG TTG CAA AGG-3'	82
<i>TLR4</i>	U88880	sense: 5'-CAG AGT TTC CTG CAA TGG ATC A-3', antisense: 5'-GCT TAT CTG AAG GTG TTG CAC AT-3'	85
<i>TLR5</i>	NM_003268	sense: 5'-TGC CTT GAA GCC TTC AGT TAT G-3', antisense: 5'-CCA ACC ACC ACC ATG ATG AG-3'	77
<i>TLR6</i>	NM_006068	sense: 5'-GAA GAA GAA CAA CCC TTT AGG ATA GC-3', antisense: 5'-AGG CAA ACA AAA TGG AAG CTT-3'	88
<i>TLR7</i>	NM_016562	sense: 5'-CAA CCA GAC CTC TAC ATT CCA TTT TGG AA-3', antisense: 5'-TCT TCA GTG TCC ACA TTG GAA AC-3'	68
<i>TLR7 (Gen+ Pseudogen)</i>	NM_016562	sense: 5'-TTT ACC TGG ATG GAA ACC AGC TA-3', antisense: 5'-TCA AGG CTG AGA AGC TGT AAG CTA-3'	73
<i>TLR7-Pseudogen</i>	NG_001066	sense: 5'-ATG TTG CAA AAG AGA GGC AGC AA-3', antisense: 5'-TCT TCA GTG TCC ACA TTG GAA AC-3'	116
<i>TLR8</i>	AF245703	sense: 5'-TTA TGT GTT CCA GGA ACT CAG AGA A-3', antisense: 5'-TAA TAC CCA AGT TGA TAG TCG ATA AGT TTG-3'	83
<i>TLR9</i>	AF245704	sense: 5'-CCA CCC TGG AAG AGC TAA ACC-3', antisense: 5'-GCC GTC CAT GAA TAG GAA GC-3'	161
<i>TLR10</i>	AF296673	sense: 5'-GCC CAA GGA TAG GCG TAA ATG-3', antisense: 5'-ATA GCA GCT CGA AGG TTT GCC-3'	54
<i>iNOS</i>	AF068236	sense: 5'-GGT GGA AGC GGT AAC AAA GG-3', antisense: 5'-TGC TTG GTG GCG AAG ATG A-3'	81
<i>18S</i>	X03205	sense: 5'-CAT GGT GAC CAC GGG TGA C-3', antisense: 5'-TTC CTT GGA TGT GGT AGC CG-3'	79

Tab. 9: *TLR*-, *iNOS*- und *18S*-Primer für die real-time PCR. [Das interne *TLR7*-Primerpaar findet Verwendung bei ruhenden und Zytokin-aktivierten HMEC-1 sowie HDMEC sowie bei UVB-stimulierten HDMEC (3.1.1, 3.1.3.1 und 3.1.3.3). Das interne Primerpaar wird bei den UVA-bestrahlten HDMEC (3.1.3.2) eingesetzt.]

2.2.19 Immunzytochemie

Für die Immunzytochemie wird das Universal LSAB™2 Kit verwendet. Zur Fixierung der Zellen auf den Objektträgern werden diese für 10 Min. mit Aceton behandelt. Anschließend erfolgt die Peroxidase-Unterdrückung mit 0,03 %-igem H₂O₂ für 5 Min. Nach dem Waschen der Objektträger mit TBS (pH 7,8) erfolgt das Blocken der Zellen mit 1 %-igem BSA in TBS für 60 Min. Erneutes Waschen der Objektträger bereitet die Präparate auf die Behandlung mit dem 1. Antikörper vor. Die Antikörper gegen TLR4 und TLR7 sind polyklonale anti-Ziege Antikörper der Fa. SantaCruz. Sie werden in der Verdünnung 1:50 eingesetzt und für 30 - 60 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Nach einem weiteren Waschgang wird der 2. Antikörper aufgetragen. Dieser stammt aus dem Kit der Fa. Dako und enthält biotinylierte Antikörper, unter anderem gegen Ziege. Die Inkubation dauert 15 Min. und wird durch erneutes Waschen abgestoppt. An Streptavidin gekoppelte Meerrettichperoxidase wird für 10 Min. auf die Zellen aufgetragen. Nach einem weiteren Waschschrift wird für 5 Min. eine Substrat-Chromogen-Lösung auf die Proben aufgetragen. Nach ausgiebigem Waschen werden die Zellkerne für 30 Sek. in Hämatoxilin angefärbt. Nach Entfernung des Farbstoffs werden die Objektträger in eine aufsteigende Ethanolreihe (30 - 100 %) getaucht (jede Stufe für 1 Min.). Anschließend erfolgt die Behandlung mit Isopropanol für eine weitere Minute, und es erfolgt der Abschluss in Xylolersatz für mindestens 2 Min., um letzte Wasserreste aus den Präparaten zu entfernen. Danach werden die Präparate mit Eukitt eingebettet. Die Auswertung der Zellpräparate erfolgt mit dem Zeiss Varioplan Mikroskop.

2.2.20 Statistische Methoden

Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben. Für die statistische Auswertung wurde in allen Fällen der zweiseitige Student's t-Test für unabhängige Proben angewendet. Ein $p \leq 0,05$ gilt als signifikant, d. h. ein Fehler bei der Entscheidung ein Ergebnis für "wahr" einzustufen, tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ein.

3 Ergebnisse

Bis heute ist die Expression sowie Funktionalität nur einzelner Toll-like Rezeptoren (TLRs 2, 3, 4 und 9) auf humanen Endothelzellen bekannt (39-41). Um die Bedeutung der Endothelzellen im Rahmen der angeborenen Immunantwort weiter aufzuklären, wurden die Endothelzelllinie HMEC-1 sowie primäre Endothelzellen (HDMEC) bezüglich ihrer TLR-Expression charakterisiert und die funktionelle Expression der Rezeptoren aufgeklärt.

3.1 *TLR-Genexpression auf Endothelzellen*

3.1.1 Ruhende Endothelzellen exprimieren die meisten der zehn bekannten TLR-Gene

Zunächst wurde an der mikrovaskulären Endothelzelllinie HMEC-1 die TLR-Expression charakterisiert. Im Weiteren wurden diese Ergebnisse dann mit denen der primären mikrovaskulären Endothelzellen verglichen. Die Zellen wurden bis zur 80 - 90 %-igen Konfluenz herangezogen, und es erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA und eine anschließende reverse Transkription in cDNA.

Um die im Pool der isolierten Nukleinsäuren enthaltene genomische DNA zu eliminieren, wurde eine "on-column" DNase-Behandlung durchgeführt, da die Primer für die real-time PCR keine Exon-Exon-Grenzen umspannen und folglich in der PCR nicht nur cDNA, sondern auch genomische DNA mitamplifizieren würde.

Die Untersuchung der mikrovaskulären Endothelzelllinie HMEC-1 zeigte, dass auf Genebene acht von den zehn bekannten TLRs (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR9 und TLR10) in ruhenden Zellen exprimiert werden. Die Expression von TLR7 und TLR8 kann im Rahmen der Real-time PCR-Methode nicht nachgewiesen werden (Abb. 4).

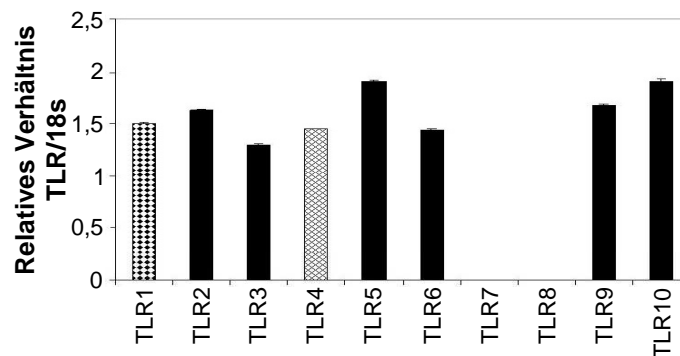


Abb. 4: TLR-Expression in ruhenden HMEC-1. Acht von zehn TLRs werden in ruhenden immortalisierten mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert, ermittelt durch zweistufige quantitative RT/real-time PCRs. Alle Rezeptoren zählen zu den sogenannten "Low-copy Genen". Abhängig von den in der real-time PCR eingesetzten Template-Mengen (TLR1: 20 ng, TLR4: 4 ng, übrige TLRs: 100 ng) werden C_T -Werte zwischen 25 - 36,5 ermittelt. TLR1 wird etwa 5-fach stärker exprimiert als die anderen Rezeptoren, TLR4 etwa 20-fach. Die PCR-Produkte für TLRs 7 und 8 können im Rahmen der Methode innerhalb von 40 Zyklen nicht detektiert werden [$n = 3$].

Untersucht man dazu vergleichend primäre Endothelzellen, so zeigte sich, dass sieben von zehn bekannten TLRs (TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 9) exprimiert werden. Zusätzlich zum TLR7 und TLR8, die auch in der Zelllinie nicht detektiert werden konnten, wird auch TLR10 nicht auf ruhenden HDMEC exprimiert (Abb. 5).

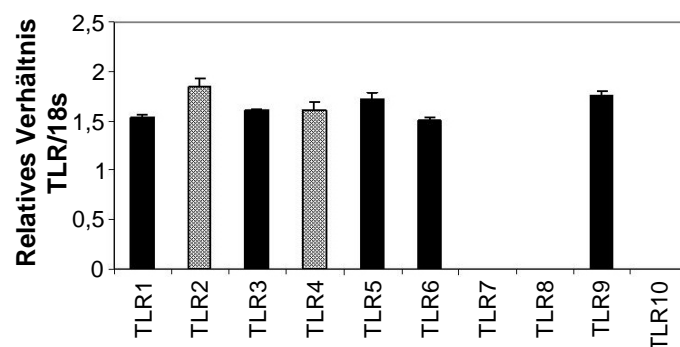


Abb. 5: TLR-Expression in ruhenden HDMEC. Sieben von zehn TLRs werden in ruhenden primären mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert. Auch hier zählen alle Rezeptoren zu den sogenannten "Low-copy Genen". Abhängig von den in der real-time PCR eingesetzten Template-Mengen (TLRs 2 und 4: 4 ng, übrige TLRs: 100 ng) werden C_T -Werte zwischen 25 - 36,5 ermittelt. TLRs 2 und 4 werden etwa 20-fach stärker exprimiert als die anderen Rezeptoren. Die PCR-Produkte für TLRs 7, 8 und 10 können im Rahmen der zweistufigen quantitativen RT/real-time PCRs innerhalb von 40 Zyklen nicht detektiert werden [$n = 3$].

Anhand der in der Real-time PCR für optimale Reaktionsbedingungen benötigten Templatemengen kann eine Abschätzung der Expressionsstärke der einzelnen Rezeptoren erfolgen. Bei HMEC-1 wird TLR4 auf mRNA-Ebene am stärksten exprimiert und benötigt die geringste Templatemenge (4 ng), um mittlere C_T -Werte von ~ 25 zu erreichen. Ebenfalls stärkere Präsenz zeigt TLR1, wo die optimale Templatemenge 20 ng pro Reaktionsansatz beträgt. Die TLRs 2, 3, 5, 6, 9 und 10 werden im Vergleich dazu schwach exprimiert und benötigen die höchste Menge an Template (100 ng) zur Erlangung eines Signals mit C_T -Werten von 25 - 36,5. Die Amplifikationskurven des TLR7 und TLR8 erreichen innerhalb von 40 PCR-Zyklen kein Plateauniveau, daher werden diese beiden Rezeptoren als nicht-exprimiert eingestuft.

Auch die primären Endothelzellen HDMEC exprimieren TLR2 und TLR4 am stärksten und benötigen für optimale Reaktionsbedingungen 4 ng cDNA (mittlere C_T -Werte von ~ 25). Die TLRs 1, 3, 5, 6 und 9 werden relativ schwächer exprimiert (C_T -Werte von 25 - 36). Hier werden 100 ng pro Reaktionsansatz als Template zur Erreichung eines Signals gebraucht. Zusätzlich zu den TLRs 7 und 8 wird bei den primären Endothelzellen auch TLR10 nicht in ruhenden Zellen exprimiert. Die Amplifikationskurven erreichen auch hier innerhalb von 40 Zyklen kein Plateauniveau.

Die abgeschätzte Expressionsstärken für die verschiedenen TLRs sind für beide Zelltypen - Endothelzelllinie und primäre Endothelzellen - in Tabelle 10 aufgeführt.

Expressionsstärke	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10
HMEC-1	++	+	+	+++	+	+	-	-	+	+
HDMEC	+	+++	+	+++	+	+	-	-	+	-

Tab. 10: Übersicht zur Expressionsstärke der verschiedenen TLRs bei ruhenden HMEC-1 sowie HDMEC. Anhand der in der real-time PCR einzusetzenden Templatemengen kann die Expressionsstärke der TLRs grob abgeschätzt werden. -: keine Expression im Rahmen der real-time PCR nachweisbar, +: schwache TLR-Expression, benötigt hohe cDNA-Mengen (100 ng cDNA) für mittlere C_T -Werte, ++: mittelstarke TLR-Expression, benötigt mittlere cDNA-Mengen (20 ng cDNA) für mittlere C_T -Werte, +++: stärkste TLR-Expression, benötigt die geringsten cDNA-Mengen (4 ng cDNA) für mittlere C_T -Werte.

3.1.2 Zeitreihenuntersuchungen zur TLR-Expression

Um die TLR-Expression bzw. Veränderungen der Expressionsintensität untersuchen zu können, musste zunächst die optimale Behandlungsdauer mit proinflammatorischen Stimuli bestimmt werden. Dazu wurden für einen Zeitraum von 4 - 48 Stunden primäre Endothelzellen in An- und Abwesenheit mit proinflammatorischen Zytokinen (IL- β , TNF- α , IFN- γ ; 1000 U/ml je Zytokin) kultiviert. Nach Isolierung der RNA wurde eine reverse Transkription und anschließend eine konventionelle PCR für die Gene TLR2 und TLR4 durchgeführt. Um im linearen Bereich der jeweiligen PCR zu bleiben, wurden für ruhende als auch aktivierte Zellen bei beiden Genen unterschiedliche Zyklenzahlen verwendet (ruhende HDMEC - TLR2: 34 Zyklen, TLR4: 25 Zyklen, aktivierte HDMEC - TLR2: 28 Zyklen, TLR4: 24 Zyklen). Nach der Agarosegelelektrophorese wurde die Intensität der Ethidiumbromid-gefärbten PCR-Produkte digital aufgezeichnet und densitometrisch ausgewertet. Die relative Genexpression der jeweiligen 18-Stunden-Werte wurde für ruhende als auch aktivierte HDMEC gleich 10 gesetzt, und dann wurden die anderen Ergebnisse daraufhin normiert.

Es zeigte sich, dass die TLR-Expression im zeitlichen Kontext von 4 - 48 Stunden nur geringfügig schwankt. Sowohl bei ruhenden als auch bei aktivierten Zellen zeigte sich jedoch deutlich, dass bei etwa 18 Stunden eine sehr hohe Konstanz sowohl in der TLR2- als auch TLR4-Expression auftritt, die etwa weitere 12 Stunden anhält (Abb. 6).

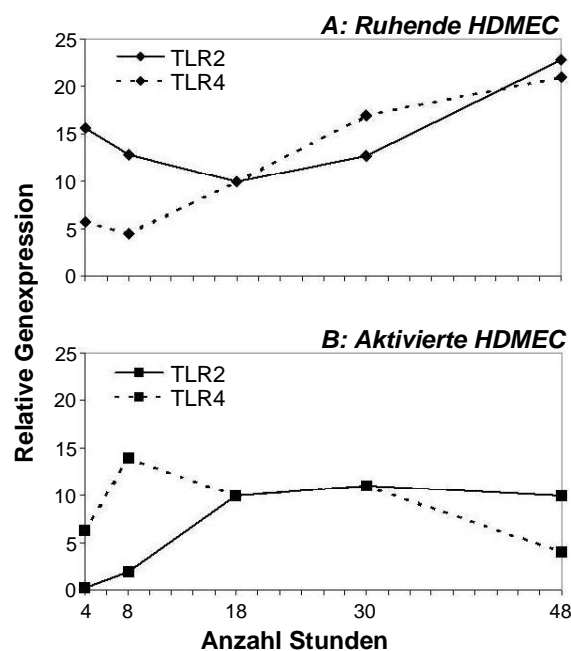


Abb. 6: Kinetik zur TLR-Expression. Um geeignete Inkubationszeiten mit proinflammatorischen Stimuli zu bestimmen, wurden primäre Endothelzellen für 4 - 48 Stunden mit dem Zytokinriplett IL-1 β , TNF- α und IFN- γ (1000 U/ml) behandelt. Nach Aufarbeitung der Proben wurde eine konventionelle PCR durchgeführt und die Gene TLR2 und TLR4 detektiert. Bei ruhenden Endothelzellen befindet sich der mittlere lineare Bereich der PCR-Reaktion bei 34 Zyklen für TLR2 und 25 Zyklen für TLR4. Die Expression des TLR2 bzw. TLR4 bei aktivierten HDMEC wurde mit 28 bzw. 24 Zyklen nachgewiesen. Die relativen Genexpressionen der 18-Stunden-Werte sowohl der ruhenden als auch aktivierten Zellen wurden = 10 gesetzt. Es zeigt sich, dass eine Inkubationszeit von etwa 18 Stunden nach Aussaat zur Detektion von TLR2 und TLR4 sowohl bei ruhenden (A) als auch aktivierten Endothelzellen (B) optimal geeignet ist [n = 1].

Aufgrund dieses Ergebnisses und aufgrund der Durchführbarkeit der Folgeexperimente wurde für die Aktivierung der Zellen mit proinflammatorischen Stimuli eine Inkubationsdauer von 18 Stunden festgelegt. Dabei wurde angenommen, dass die anderen zu untersuchenden TLRs sich in ihrer Expression etwa ähnlich verhalten.

3.1.3 Differentielle Modulation der TLR-Genexpression auf Endothelzellen durch verschiedene Entzündungsstimuli

Für eine Charakterisierung der Endothelzellen bezüglich der Modulationsfähigkeit der TLR-Expression wurden die Zellen mit verschiedenen proinflammatorischen Stimuli behandelt. Dazu zählen das proinflammatorische Zytokinriplett IL-1 β , TNF- α und IFN- γ (je 1000 U/ml) sowie verschiedene Dosen an UVA- und UVB-Strahlung.

3.1.3.1 ***Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die TLR-Genexpression***

Um die Expressionsmodulation der TLRs unter proinflammatorischen Bedingungen zu untersuchen, wurden sowohl die Endothelzelllinie HMEC-1 als auch primäre Endothelzellen HDMEC für 18 Stunden in Anwesenheit des proinflammatorischen Zytokintripletts (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) kultiviert. RNA-Isolierung, reverse Transkription und quantitative Real-time PCR wurden analog zu den ruhenden Zellen durchgeführt.

In proinflammatorisch aktivierten HMEC-1 wurden alle zehn TLRs exprimiert. Die Zytokinbehandlung führte zu einer signifikanten Erhöhung der Expression des TLR2 (Faktor 14 ± 1) und des TLR3 (Faktor $1,4 \pm 0,03$) sowie zu einer *de novo*-Synthese der TLRs 7 und 8. Die Expression des TLR7 ist unter proinflammatorischen Bedingungen sehr stark, wodurch sich eine deutliche Signifikanz ergibt. TLR6 (Faktor $0,7 \pm 0,04$) ist der einzige Rezeptor, der bei den gegebenen Kulturbedingungen signifikant unter dem Spiegel von ruhenden HMEC-1 exprimiert wird. Die TLRs 1, 4, 5, 9 und 10 werden konstitutiv exprimiert und zeigen keine differentielle Expressionsmodulation in Anwesenheit proinflammatorischer Entzündungsmediatoren (Abb. 7).

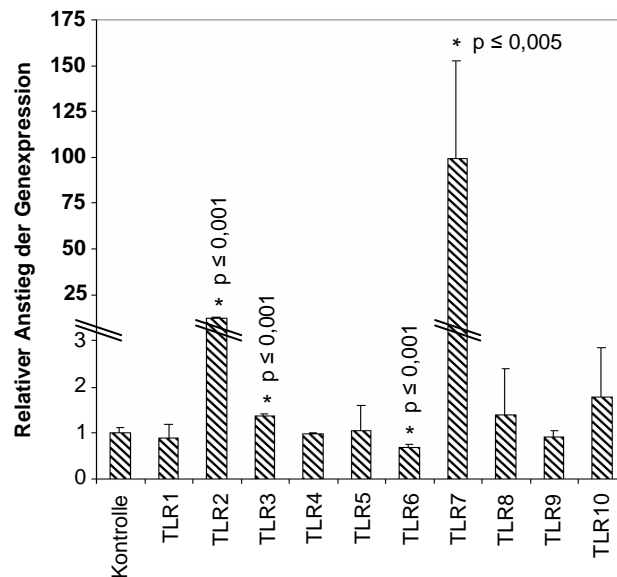


Abb. 7: TLR-Expression in aktivierten HMEC-1. Die 18-stündige Kultur von HMEC-1 unter proinflammatorischen Bedingungen (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ; 1000 U/ml je Zytokin) führt zur Expression aller zehn bekannten humanen TLRs, ermittelt durch zweistufige quantitative RT/real-time PCRs. Die Expression auf Genebene wird bei den TLRs 2 (Faktor 14) und 3 (Faktor 1,4) signifikant gesteigert. Die TLRs 7 und 8 werden *de novo* exprimiert, wobei der mRNA-Level von TLR7 unter den gegebenen Kulturbedingungen signifikant ansteigt. Überraschenderweise wird die Expression des TLR6 (Faktor 0,7) im Rahmen einer Entzündungsreaktion signifikant herunterreguliert. Die übrigen Rezeptoren zeigen keine Veränderungen der Genexpression unter den gegebenen Bedingungen. Kontrolle ist der jeweils exprimierte TLR in ruhenden Zellen = 1 [n = 3].

Unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine exprimieren primäre Endothelzellen ebenfalls alle zehn bekannten TLRs. Die Expression des TLR1 (Faktor $3,1 \pm 0,6$), des TLR2 (Faktor $38,3 \pm 36,7$) und des TLR3 (Faktor $9,1 \pm 2,1$) ist signifikant gesteigert. Die Rezeptoren TLR7, TLR8 und TLR10 werden *de novo* exprimiert. TLR5 wird auf Genebene unter proinflammatorischen Bedingungen signifikant herunterreguliert (Faktor $0,35 \pm 0,07$). Eine Regulation der Genexpression konnte für die TLRs 4, 6 und 9 in HDMEC nicht beobachtet werden (Abb. 8).

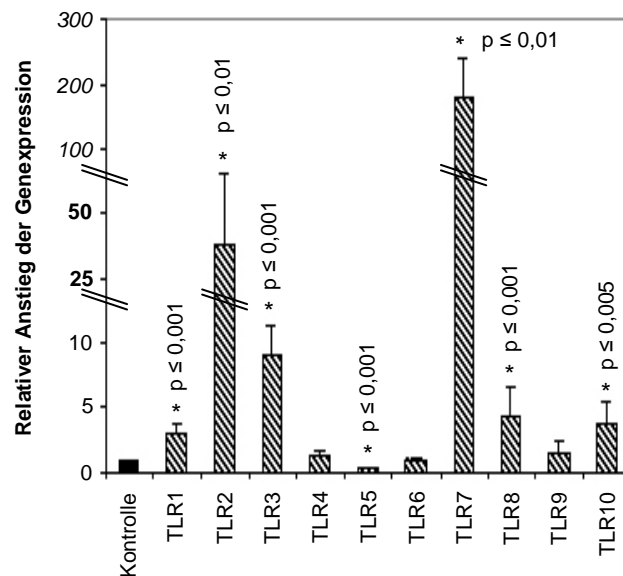


Abb. 8: TLR-Expression in aktivierten HDMEC. Nach 18-stündiger Inkubation unter proinflammatorischen Bedingungen (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ; 1000 U/ml je Zytokin) exprimieren die HDMEC alle zehn bekannten TLRs. Die Expression auf Genebene wird bei den TLRs 1 (Faktor 3,1), 2 (Faktor 38,3) und 3 (Faktor 9,1) signifikant gesteigert. Die TLRs 7, 8 und 10 werden *de novo* exprimiert. Interessanterweise wird die Expression des TLR5 (Faktor 0,35) im Rahmen einer Entzündungssituation signifikant herunterreguliert. TLRs 4, 6 und 9 werden konstitutiv exprimiert [n = 3].

3.1.3.2 Einfluss von UVA-Strahlung auf die TLR-Genexpression

Um zu untersuchen, ob die TLR-Expression bei verschiedenen proinflammatorischen Stimuli variiert, wurden sowohl ruhende als auch mit dem Zytokinriplett voraktivierte primäre Hautendothelzellen eines Donors mit verschiedenen UVA-Dosen behandelt.

Zur Ermittlung geeigneter Dosen wurden die HDMEC eines Donors mit 0 - 40 J/cm² UVA bestrahlt. Nach 24-stündiger Kultur wurden die Zellen einem Vitalitätsassay unterzogen. Dadurch konnte die relative Anzahl lebender Zellen bzw. deren Wachstumsverhalten bestimmt werden. Es zeigte sich, dass UVA-Dosen bis zu 40 J/cm² bei ruhenden Hautendothelzellen zu einer Wachstumssteigerung von bis zu 30 % führen und dass Dosen bis 30 J/cm² nur geringfügig toxisch für Zytokin-aktivierte Zellen sind (Abb. 9).

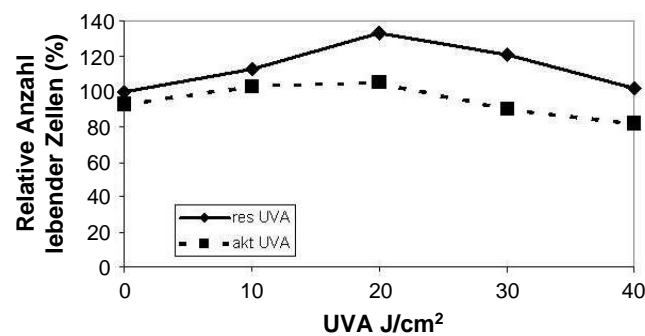


Abb. 9: Vitalitätsassay - UVA-Bestrahlung. Ruhende und Zytokin-aktivierte primäre Endothelzellen wurden mit verschiedenen UVA-Dosen (0 - 40 J/cm²) bestrahlt. Danach wurden die Zellen für 24 Stunden weiter kultiviert und es erfolgte die Bestimmung der relativen Anzahl lebender Zellen bzw. des Wachstumsverhaltens mittels Neutralrotfärbung. Die relative Anzahl ruhender, nicht-bestrahlter Zellen entspricht 100 % [n = 1].

Anhand der Ergebnisse des Vitalitätsassays wurden in den nachfolgenden Versuchen UVA-Dosen von 10 und 30 J/cm² gewählt. Die verwendeten Dosen liegen im physiologischen Bereich und simulieren eine leichte Sonnenbestrahlung beziehungsweise einen Sonnenbrand und damit unterschiedlich starke Entzündungsreize.

Nachdem ruhende und Zytokin-aktivierte HDMEC mit den entsprechenden UVA-Dosen (10 und 30 J/cm²) bestrahlt worden waren und dann für weitere 18 Stunden weiter kultiviert wurden, erfolgte eine entsprechende Aufarbeitung der Proben, und es wurde erneut eine zweistufige quantitative RT/Real-time PCR durchgeführt.

Bei der Untersuchung zur Expressionsmodulation der TLRs durch UVA-Bestrahlung zeigte nur TLR4 einen leichten Anstieg der Expression bei 10 J/cm² (Faktor 1,6). Eine starke *de novo*-Synthese ist für den TLR7 bei einer Dosis von 30 J/cm² UVA zu beobachten (Faktor 15,5). Weiter konnte eine *de novo*-Expression des TLR8 nach geringer UVA-Dosis detektiert werden. Alle anderen Rezeptoren sprachen nicht auf eine UVA-Behandlung an (Abb. 10).

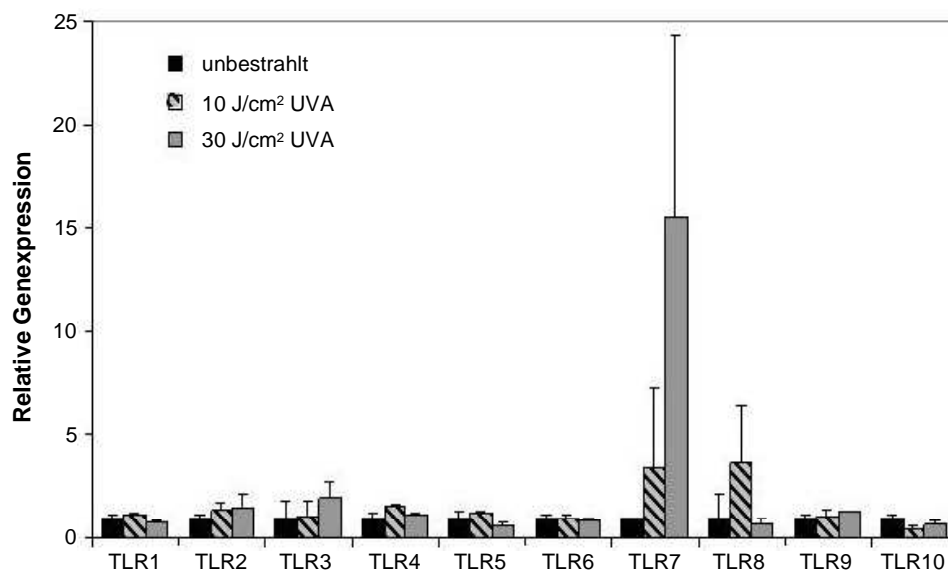


Abb. 10: TLR-Expression nach UVA-Bestrahlung bei ruhenden HDMEC. Ruhende HDMEC wurden mit unterschiedlichen Dosen an UVA-Strahlung behandelt (10 und 30 J/cm² UVA). Nach 18 Stunden wurden die Proben aufgearbeitet und mittels zweistufiger quantitativer RT/real-time PCR auf die TLR-Expressionsmodulation hin untersucht. TLR4 wird bei 10 J/cm² UVA signifikant hochreguliert (Faktor 1,6). TLR7 wird bei einer UVA-Dosis von 30 J/cm² *de novo* synthetisiert (Faktor 15,5). Bei TLR8 findet eine *de novo*-Expression nach Bestrahlung der Zellen mit 10 J/cm² statt. Die übrigen Rezeptoren werden trotz des Bestrahlungsreizes konstitutiv exprimiert. Die Grafik zeigt die Ergebnisse für einen Donor, die Standardabweichungen ergeben sich aus der Triplettmessung [n = 1].

Im Vergleich zu den ruhenden primären Hautendothelzellen sollen hier mit proinflammatorischen Zytokinen voraktivierte HDMEC mit unterschiedlichen UVA-Dosen (10 und 30 J/cm²) bestrahlt werden. Dabei zeigten die voraktivierten Endothelzellen eine nahezu durchgängige Tendenz zur reduzierten TLR-Expression auf mRNA-Ebene.

TLR1, TLR4 und TLR9 werden sowohl bei niedrigen als auch bei hohen UV-Dosen herunterreguliert. TLR1 zeigte eine Expressionsreduktion vom Faktor 0,4 bei niedriger bzw. von 0,7 bei hoher Strahlenbelastung, TLR4 wird um den Faktor 0,3 bzw. 0,4 herunterreguliert. TLR9 zeigte einen Expressionsrückgang vom Faktor 0,3 bzw. 0,8 gegenüber unbestrahlten Zellen. Die TLRs 6 und 10 reagieren bei 10 J/cm² UVA mit einer reduzierten Expression (Faktor 0,3/TLR6 und Faktor 0,6/TLR10). Die TLR7-Expression hingegen wurde erst bei höherer UV-Exposition (30 J/cm² UVA) um 80 % reduziert. TLR2 ist der einzige der zehn Rezeptoren, der unter der hohen UVA-Dosis eine Tendenz zur Expressionssteigerung zeigte (Abb. 11).

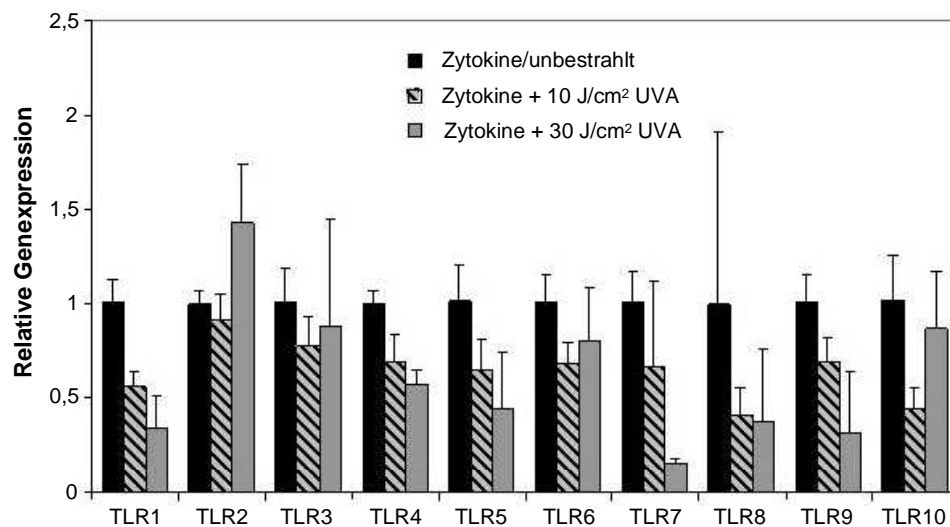


Abb. 11: TLR-Expression nach UVA-Bestrahlung bei aktivierten HDMEC. Mit proinflammatorischen Zytokinen für 18 Stunden voraktivierte HDMEC wurden mit UVA (10 und 30 J/cm² UVA) bestrahlt. Die Zellen wurden für weitere 18 Stunden kultiviert und für die zweistufige quantitative RT/real-time PCR vorbereitet. Insgesamt zeichnet sich unter den gegebenen Kulturbedingungen für alle Rezeptoren eine eher reduzierte TLR-Expression unter UVA-Strahlung ab. Die Grafik zeigt, wie bei den nicht-voraktivierten HDMEC, die Ergebnisse für einen Donor, die Standardabweichungen ergeben sich aus der Triplettmessung [n = 1].

3.1.3.3 Einfluss von UVB-Strahlung auf die TLR-Genexpression

Analog zu den UVA-Versuchen wurden sowohl ruhende als auch mit dem Zytokintriplett voraktivierte primäre Hautendothelzellen mit verschiedenen UVB-Dosen behandelt. Um die geeigneten UVB-Strahlenmengen zu ermitteln, wurden HDMEC eines Donors mit 0 - 30 mJ/cm² UVB bestrahlt. Nach 24-stündiger Kultur wurden die Zellen, wie unter 3.1.3.2 beschrieben, einem Vitalitätsassay unterzogen.

Bei der UVB-Bestrahlung kann man eine Toxizität für nicht-aktivierte Endothelzellen ab 15 mJ/cm² von bis zu 30 % beobachten. Zytokin-aktivierte Zellen zeigten eine größere Sensitivität für UVB-Bestrahlung, und es ließ sich bereits ab 5 mJ/cm² ein Verlust der Vitalität (20 - 40 %) beobachten.

Die sowohl bei niedrigen als auch hohen UVA-Dosen beobachteten Effekte der Wachstumssteigerung können bei UVB-Bestrahlung, unabhängig von der Strahlenmenge, nicht festgestellt werden. Diese langwelligere Strahlenart weist eine höhere Toxizitätseigenschaft als die UVA-Strahlung auf (Abb. 12).

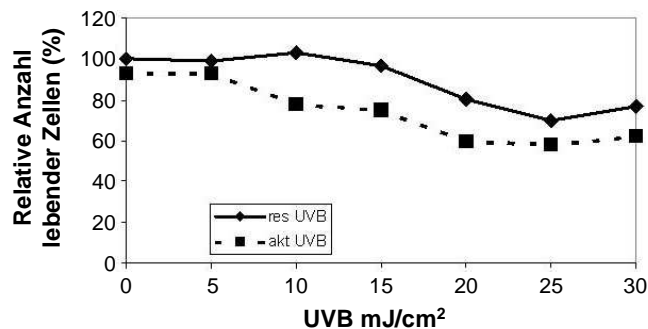


Abb. 12: Vitalitätsassay - UVB-Bestrahlung. Ruhende und Zytokin-aktivierte primäre Endothelzellen wurden mit verschiedenen UVB-Dosen (0 - 30 mJ/cm²) bestrahlt. Danach wurden die Zellen für 24 Stunden weiter kultiviert und es erfolgte die Bestimmung der relativen Anzahl lebender Zellen bzw. des Wachstumsverhaltens mittels Neutralrotfärbung. Die relative Anzahl ruhender, nicht-bestrahlter Zellen entspricht 100 % [n = 1].

Aufgrund der Ergebnisse des Vitalitätsassays mit UVB-bestrahlten Endothelzellen wurden für den nachfolgenden Versuch UVB-Dosen von 5 und 25 mJ/cm² verwendet. Der niedrige Wert reicht aus, um eine Entzündungsreaktion hervorzurufen, ist jedoch nicht toxisch für die Zellen. Der hohe Wert der UVB-Strahlung wurde gewählt, da er ein gutes Beispiel für die Effekte eines ausgeprägten Sonnenbrandes darstellt und gesichert mit phototoxischen Veränderungen der DNA einhergeht.

Sowohl ruhende als auch mit dem Zytokinriplett aktivierte primäre Endothelzellen zweier Donoren wurden mit den unterschiedlichen UVB-Dosen (5 und 25 mJ/cm²) bestrahlt und die Modulation der TLR-Expression ebenfalls mittels zweistufiger quantitativer RT/real-time PCR charakterisiert.

Werden ruhende Endothelzellen mit geringer UVB-Bestrahlung (5 mJ/cm²) behandelt, zeigt TLR1 eine Expressionssteigerung vom Faktor 1,7. TLR5 reagiert mit einer Expressionsreduktion von 30 bzw. 35 % auf die UVB-Bestrahlung (5 mJ/cm² bzw. 25 mJ/cm²). TLR9 wird bei hoher UVB-Bestrahlung (25 mJ/cm²) um den Faktor 4,6 auf Genebene hochreguliert. Die Rezeptoren TLR7, TLR8 und TLR10 werden unter UVB-Bestrahlung, vor allem bei der hohen UVB-Dosis, *de novo* exprimiert. Die Expression der übrigen TLRs wird durch UVB-Bestrahlung, unabhängig von der Dosis, nicht beeinflusst (Abb. 13).

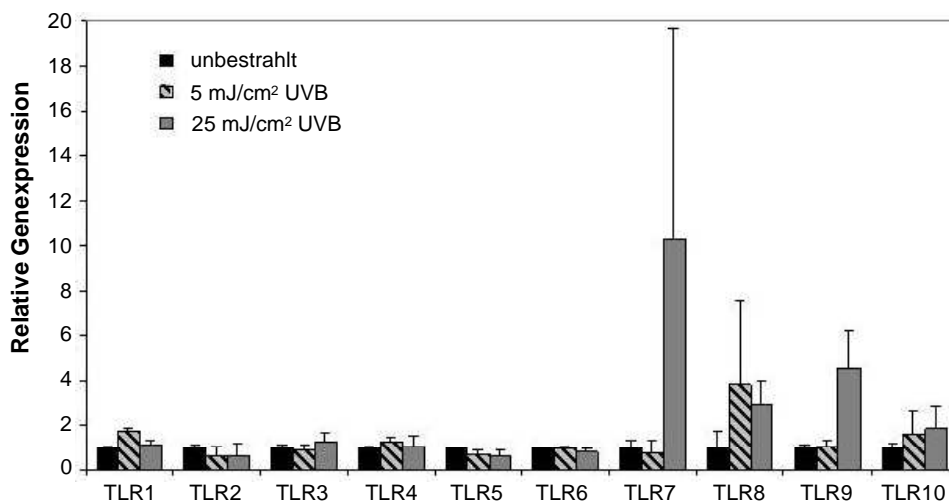


Abb. 13: TLR-Expression nach UVB-Bestrahlung bei ruhenden HDMEC. Ruhende HDMEC wurden mit 5 bzw. 25 mJ/cm² UVB bestrahlt und für 18 Stunden weiter kultiviert. Nach Aufarbeitung der Proben wurde eine zweistufige quantitative RT/real-time PCR zur Ermittlung der TLR-Expressionsmodulation durchgeführt. TLR1 zeigt bei der gegebenen Behandlung eine geringe Expressionssteigerung bei 5 mJ/cm², TLR5 reagiert mit einer Expressionsreduktion bei beiden UVB-Dosen. TLR9 ist der einzige Rezeptor, der unter hoher UVB-Dosis mit einer Expressionssteigerung reagiert. Die TLRs 7, 8 und 10 werden unter dem Einfluss von UVB-Strahlung *de novo* exprimiert. Angegeben sind die relativen Expressionsmodulationen, wobei der korrespondierende TLR der unbestrahlten Kontrolle = 1 ist [n = 2].

In Zytokin-aktivierten Endothelzellen führte die UVB-Bestrahlung fast durchgängig zu einer Expressionsreduktion aller zehn bekannten TLRs. Die Rezeptoren TLR1, TLR2, TLR4 und TLR7 werden sowohl bei niedriger (5 mJ/cm²) als auch hoher UVB-Dosis (25 mJ/cm²) herunterreguliert (TLR1: 20 bzw. 60 %, TLR2: 40 bzw. 70 %, TLR4: 30 % für beide UV-Dosen, TLR7: 40 bzw. 50 %). Die Expression des TLR3 und des TLR6 wird nur bei hohen UVB-Dosen herunterreguliert, und zwar um den Faktor 0,5 bei beiden Rezeptoren. TLR8 hingegen zeigte nur bei geringer UVB-Bestrahlung eine Expressionsreduktion vom Faktor 0,4. Einzig TLR9 wird unter hoher UVB-Bestrahlung hochreguliert (Faktor 2,8). Die Expression des TLR10 auf Genebene unterliegt bei hoher UVB-Bestrahlung starken, methodisch bedingten Standardabweichungen (Abb. 14).

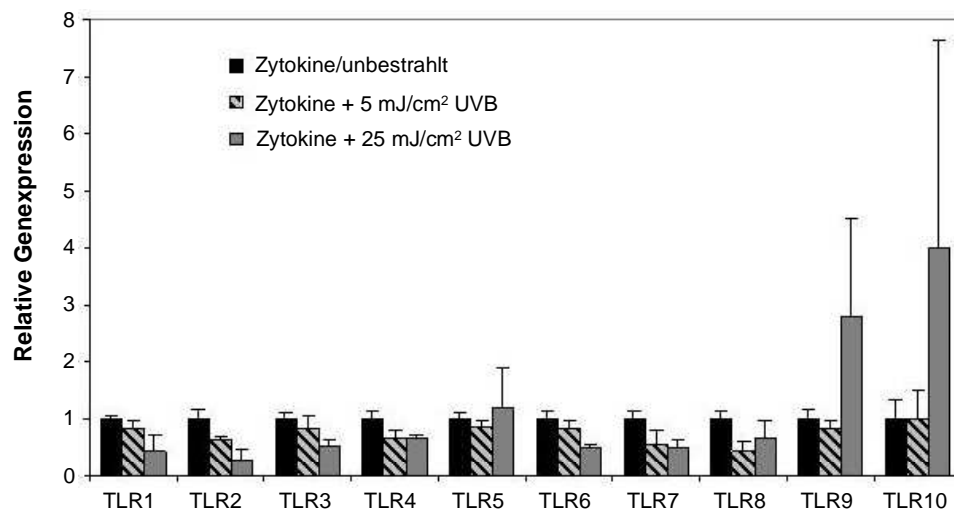


Abb. 14: TLR-Expression nach UVB-Bestrahlung bei aktivierten HDMEC. Mit proinflammatorischen Zytokinen aktivierte HDMEC wurden mit 5 bzw. 25 mJ/cm² UVB bestrahlt und anschließend für 18 Stunden weiter kultiviert. Nach Aufarbeitung der Proben wurde eine zweistufige quantitative RT/real-time PCR durchgeführt. Angegeben sind die relativen Expressionsmodulationen, wobei der korrespondierende TLR der unbestrahlten Proben = 1 gesetzt ist [n = 2, für TLR7 ist n = 3].

Um die TLR-Expression auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurden HDMEC mit proinflammatorischen Zytokinen aktiviert und anschließend mit einer hohen Dosis UVB-Strahlung (25 mJ/cm²) behandelt. Nach 24-stündiger Kultur wurden die Zellen einer Immuncytochemie zur Detektion des TLR4 und TLR7 unterzogen.

Bei den unbestrahlten Präparaten sah man deutlich die Färbungen sowohl des TLR4 als auch des TLR7. Beim TLR4 erkennt man deutlich die Reduktion der Proteinfärbung nach UVB-Bestrahlung. Einen leichten Rückgang der Antikörperfärbung ist auch beim TLR7 zu beobachten. Die Ergebnisse der TLR-Expression auf Proteinebene korrelieren in beiden Fällen mit der Expressionsmodulation auf Genebene. Die Lokalisation beider Rezeptoren ändert sich nicht durch die Behandlung mit UVB-Strahlung (Abb. 15).

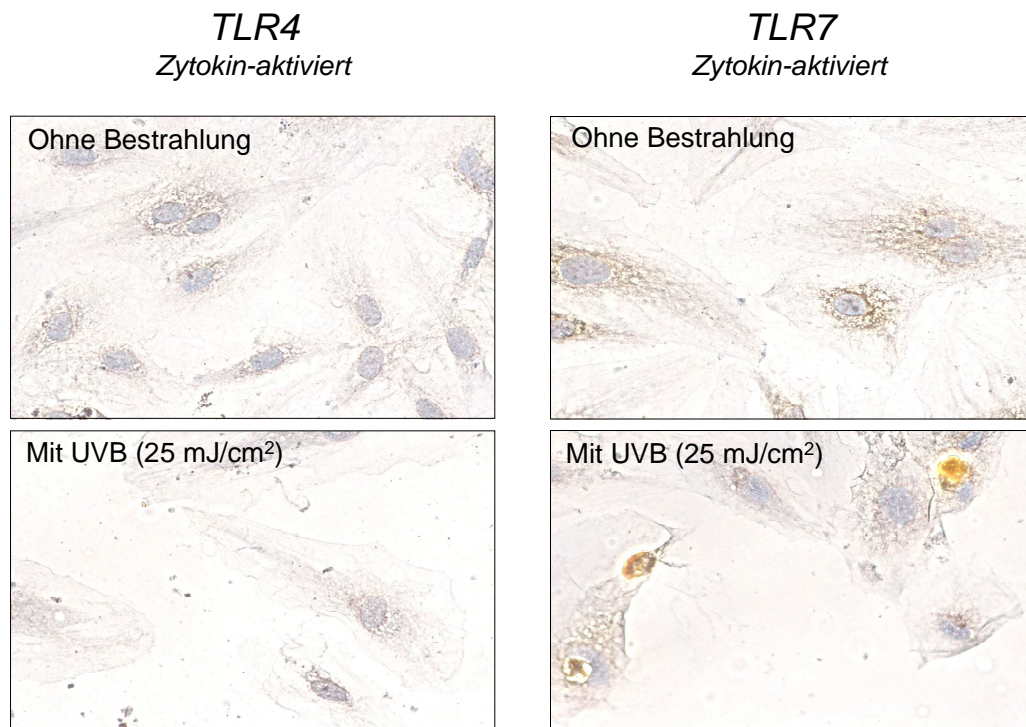


Abb. 15: Detektion von TLR4 und TLR7 mittels Immunzytochemie. Primäre mikrovaskuläre Endothelzellen wurden für 24 Stunden mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ; 1000 U/ml je Zytokin) inkubiert und dann mit UVB-Strahlung (25 mJ/cm²) behandelt. Die Detektion des TLR4 und des TLR7 (braune Färbung) erfolgte mit polyklonalen anti-Ziege-Antikörpern. Der Zweitantikörper ist an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt. Der Zellkern wurde mit Hämatoxilin angefärbt. Auf Proteinebene sieht man eine Abnahme des TLR4 sowie des TLR7 bei bestrahlten Zellen. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus vier Versuchen.

3.2 TLRs auf Endothelzellen werden funktionell exprimiert

Um zu untersuchen, ob die auf Genebene exprimierten TLRs auch auf Proteinebene funktionell sind, wurden humane Endothelzellen mit verschiedenen TLR-spezifischen Liganden (Pam₃Cys, LTA, PGN, Poly(I:C), LPS, Flagellin, Imiquimod und CpG-DNA) inkubiert. Entsprechend der nachfolgenden Entzündungskaskade wurden die Entzündungsparameter IL-8-Sekretion (frühes Signal) und iNOS-Expression (spätes Signal) untersucht und als Marker der TLR-Funktionalität herangezogen.

3.2.1 TLR-spezifische Liganden modulieren die Freisetzung des Chemokins IL-8 aus Endothelzellen

Zur Untersuchung der IL-8-Sekretion wurden ruhende sowie mit dem proinflammatorischen Zytokintriplett (IL- β , TNF- α , IFN- γ ; 1000 U/ml je Zytokin) voraktivierte immortalisierte und primäre Endothelzellen mit TLR-spezifischen Liganden behandelt (TLR2: Pam₃Cys 5 μ g/ml, TLR2/6: LTA 10 μ g/ml, NOD1/NOD2: PGN 25 μ g/ml, TLR3: Poly(I:C) 50 μ g/ml, TLR4: LPS 100 ng/ml, TLR5: Flagellin 500 ng/ml, TLR7: Imiquimod 10 μ M, TLR9: CpG-DNA 1 μ M). Die Behandlung der Zellen mit den TLR-spezifischen Liganden erfolgte in Anlehnung an die Ergebnisse von Sticherling *et al.* (1993) und Zhao *et al.* (2001) für eine Zeitdauer von sechs Stunden (91, 92). Die Zellkulturüberstände wurden im Sandwich-ELISA eingesetzt und die IL-8-Freisetzung der Endothelzellen quantitativ gemessen.

Ruhende HMEC-1 exprimieren einen IL-8 Level von 939 ± 170 pg/mg Zellprotein. Die meisten der im Experiment verwendeten Liganden führen zu einer signifikanten Freisetzung von IL-8. Die Inkubation der HMEC-1 mit Pam₃Cys führt zu einem Anstieg der IL-8-Sekretion auf 2598 ± 268 pg/mg Zellprotein (Faktor von 2,8). Ähnliche IL-8-Spiegel werden auch mit LTA (2656 ± 999 pg/mg Zellprotein, Faktor von 2,8) und LPS (2371 ± 206 pg/mg Zellprotein, Faktor von 2,5) erreicht. Ein deutlich höherer Anstieg der IL-8-Freisetzung wird mit Poly(I:C) beobachtet. Der Anstieg des IL-8-Spiegels erreicht hier den Faktor 3,9 (3650 ± 465 pg/mg Zellprotein). Der TLR5-Ligand Flagellin erreicht nur einen mäßigen Anstieg der IL-8-Produktion vom Faktor 1,5 (1401 ± 322 pg/mg

Zellprotein). Die Liganden PGN, Imiquimod und CpG-DNA führen zu keinen signifikanten Änderungen der IL-8-Freisetzung in HMEC-1 (Abb. 16).

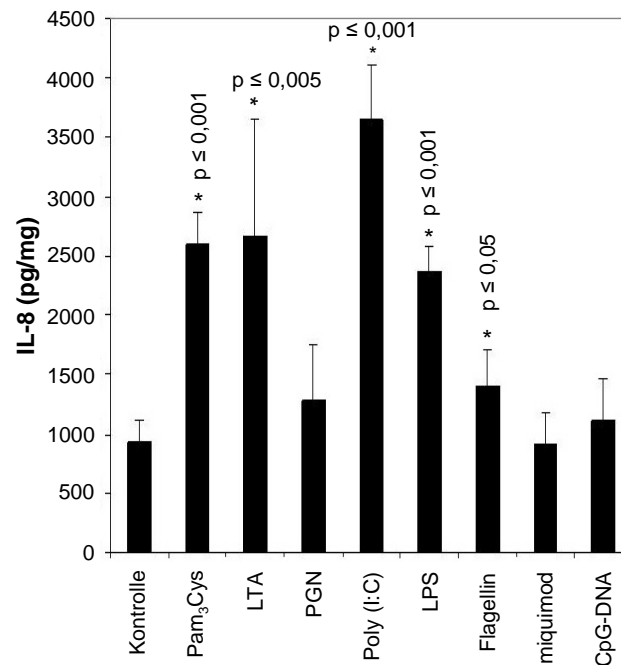


Abb. 16: IL-8-Sekretion ruhender HMEC-1 nach Behandlung mit TLR-spezifischen Liganden. Ruhende HMEC-1 setzen nach 6-stündiger Inkubation mit TLR-spezifischen Liganden spezifisch IL-8 frei, welches mittels Sandwich-ELISA quantifiziert wird. Die Behandlung der Zellen mit Pam₃Cys (5 µg/ml, TLR1/2-Ligand) führt zu einem signifikanten Anstieg der IL-8-Produktion um den Faktor 2,8, LTA (10 µg/ml, TLR2/6-Ligand) zu einem Anstieg um den Faktor 2,8, Poly(I:C) (50 µg/ml, TLR3-Ligand) zu einem Anstieg um den Faktor 3,9, LPS (100 ng/ml, TLR4-Ligand) zu einem Anstieg um den Faktor 2,5 und Flagellin (500 ng/ml, TLR5-Ligand) zu einem Anstieg um den Faktor 1,5 verglichen mit den Zellen, die ohne TLR-Liganden inkubiert werden [n = 3 - 4].

Ruhende HDMEC setzen basale IL-8-Mengen von 1262 ± 359 pg/mg Zellprotein frei und liegen damit in ihrer IL-8-Produktion um knapp 35 % über der IL-8-Freisetzung der Endothelzelllinie. Nach Zugabe der Liganden Poly(I:C) oder LPS steigen die IL-8-Konzentrationen in den Überständen der primären Endothelzellen signifikant an (5624 ± 769 pg/mg Zellprotein, Faktor von 4,5 für Poly(I:C) bzw. 14244 ± 2456 pg/mg Zellprotein, Faktor von 11,3 für LPS). Unter dem Einfluss von CpG-DNA sinkt überraschender Weise die IL-8-Freisetzung unter den Basisspiegel ruhender HDMEC (910 ± 94 pg/mg Zellprotein, Faktor von 0,7). Die Liganden Pam₃Cys, PGN, Flagellin und Imiquimod haben keinen Einfluss auf die IL-8-Sekretion (Abb. 17).

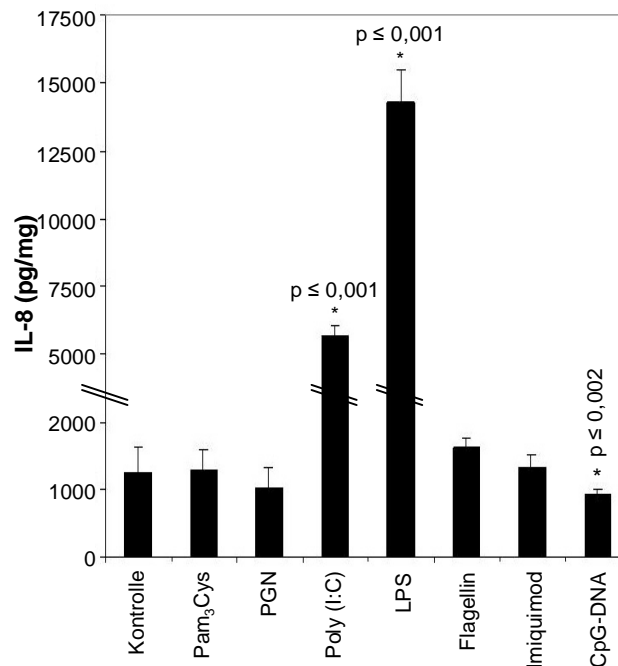


Abb 17: IL-8-Sekretion ruhender HDMEC nach Behandlung mit TLR-spezifischen Liganden. Ruhende HDMEC wurden für sechs Stunden mit TLR-spezifischen Liganden inkubiert. Der Kulturüberstand wurde im IL-8-Sandwich-ELISA gemessen. Die Zellen, die mit Poly(I:C) (50 µg/ml, TLR3-Ligand) und LPS (100 ng/ml, TLR4-Ligand) behandelt werden, weisen einen signifikanten Anstieg der IL-8-Produktion auf (Faktor 4,5 bzw. Faktor 11). Inkubation der Zellen mit CpG-DNA (1 µM, TLR9-Ligand) führt zu einer signifikanten Reduktion der IL-8-Freisetzung um den Faktor 0,7 verglichen mit HDMEC, die ohne Liganden inkubiert werden [n = 3 - 4].

Aufgrund der interessanten und überraschenden Beobachtung, dass CpG-DNA bei primären Endothelzellen zu einer Reduktion der IL-8-Freisetzung führt, wurde die Endothellinie mit verschiedenen Konzentrationen an CpG-DNA behandelt. Damit sollte verifiziert werden, ob der beobachtete Effekt ausschließlich bei primären Endothelzellen vorkommt und die Eigenschaft bei den immortalisierten Zellen verloren gegangen ist oder ob eine unterschiedliche Rezeptordichte von primären und immortalisierten Endothelzellen die Ursache darstellt.

Eine Konzentrationsreihe mit CpG-DNA (0 – 10 µM) in ruhenden HDMEC zeigte, dass die IL-8-Freisetzung durch HMEC-1 konzentrationsabhängig ist. Konzentrationen von 0,2 - 1 µM haben einen leichten Anstieg der IL-8-Ausschüttung zur Folge. CpG-DNA-Konzentrationen von 5 µM führen jedoch zu einer reduzierten IL-8-Freisetzung und 10 µM führen zu einer deutlich geringeren IL-8-Sekretion (Faktor von 0,39) (Abb. 18).

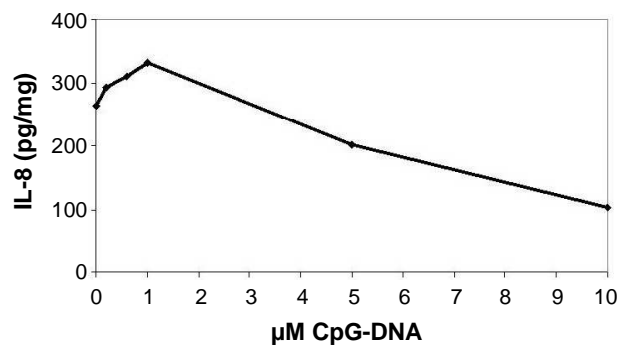


Abb. 18: Einfluss verschiedener CpG-DNA-Konzentrationen auf die IL-8-Sekretion ruhender HMEC-1. Ruhende HMEC-1 wurden für sechs Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an CpG-DNA (0 - 10 µM) inkubiert. Die Messung der IL-8-Mengen in den Zellkulturüberständen mittels Sandwich-ELISA zeigt eine konzentrationsabhängige IL-8-Freisetzung. Eine Reduktion der IL-8-Sekretion, wie bei den primären Endothelzellen beobachtet, kann mit veränderten CpG-DNA-Konzentrationen > 1 µM auch in immortalisierten Zellen erreicht werden [n = 1].

Um die Reaktion der funktionellen TLR-Expression während des Entzündungsgeschehens zu untersuchen, wurden HMEC-1 für 24 Stunden mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ; 1000 U/ml je Zytokin) behandelt. Anschließend erfolgte, analog zu den ruhenden HMEC-1, eine 6-stündige Inkubation mit den TLR-spezifischen Liganden (Pam₃Cys 5 µg/ml, LTA 10 µg/ml, PGN 25 µg/ml, Poly(I:C) 50 µg/ml, LPS 100 ng/ml, Flagellin 500 ng/ml, Imiquimod 10 µM, CpG-DNA 1 µM) und die quantitative Messung der IL-8-Sekretion mittels Sandwich-ELISA.

Proinflammatorisch aktivierte HMEC-1 zeigen eine signifikant erhöhte IL-8-Freisetzung gegenüber ruhenden HMEC-1 (13824 \pm 2480 pg/mg Zellprotein *versus* 939 \pm 170 pg/mg Zellprotein, Faktor 14,7). Ein signifikanter Anstieg des IL-8-Spiegels proinflammatorisch aktivierter Zellen kann durch Behandlung der Zellen mit den Liganden Pam₃Cys (44704 \pm 11590 pg/mg Zellprotein), Poly(I:C) (27188 \pm 3559 pg/mg Zellprotein) und LPS (63482 \pm 3898 pg/mg Zellprotein) ermittelt werden. Interessanterweise ist unter proinflammatorischen Zellkulturbedingungen die IL-8-Sekretion durch Behandlung der Zellen mit Imiquimod signifikant reduziert (9752 \pm 709 pg/mg Zellprotein). Die Liganden LTA, PGN, Flagellin sowie CpG-DNA haben keinen signifikanten Einfluss auf die IL-8-Freisetzung in HMEC-1 (Abb. 19).

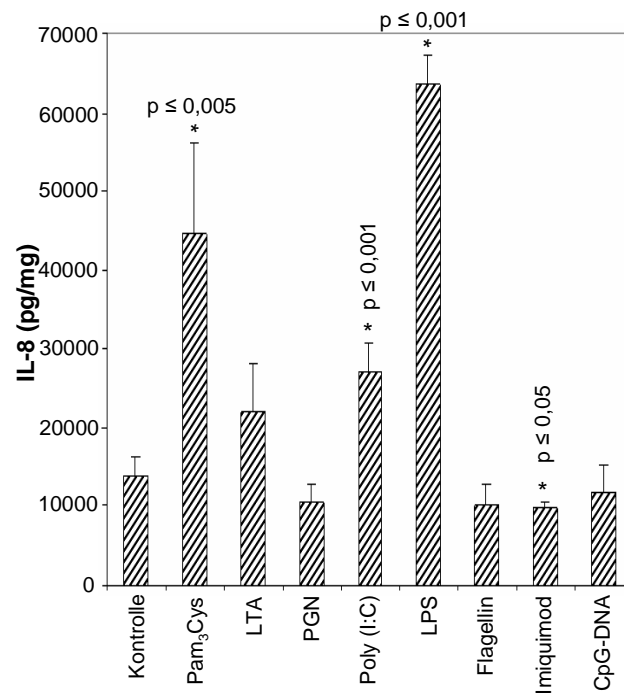


Abb. 19: IL-8-Sekretion aktivierter HMEC-1 nach Behandlung mit TLR-spezifischen Liganden. HMEC-1 wurden zunächst für 24 Stunden mit dem proinflammatorischen Zytokintriplett (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ; 1000 U/ml je Zytokin) vorinkubiert. Dann erfolgt die 6-stündige Behandlung der Zellen mit TLR-spezifischen Liganden. Mittels Sandwich-ELISA wurden die freigesetzten Mengen an IL-8 quantifiziert. Die Behandlung der Zellen mit Pam₃Cys (5 μ g/ml, TLR1/2-Ligand) führt zu einem signifikanten Anstieg der IL-8-Produktion um den Faktor 3,2, mit Poly(I:C) (50 μ g/ml, TLR3-Ligand) zu einem Anstieg um den Faktor 2, mit LPS (100 ng/ml, TLR4-Ligand) zu einem Anstieg um den Faktor 4,6 und mit Imiquimod (10 μ M, TLR7-Ligand) zu einer Reduktion der IL-8-Freisetzung um den Faktor 0,7, verglichen mit den aktivierten Zellen ohne weitere Liganden-Behandlung [n = 4].

Bei den primären Endothelzellen steigt unter dem Einfluss des proinflammatorischen Zytokintripletts nach 24 Stunden der Spiegel der IL-8-Freisetzung auf 9503 ± 1347 pg/mg Zellprotein im Vergleich zu ruhenden HDMEC (1262 ± 359 pg/mg Zellprotein). Die primären Endothelzellen steigern ihre IL-8-Produktion somit nur um den Faktor 7,5 (HMEC-1, Faktor 14,7). Die 6-stündige Zugabe TLR-spezifischer Liganden zu den aktivierten Zellen führte bei den primären Hautendothelzellen zu keiner weiteren Steigerung der IL-8-Sekretion (Abb. 20).

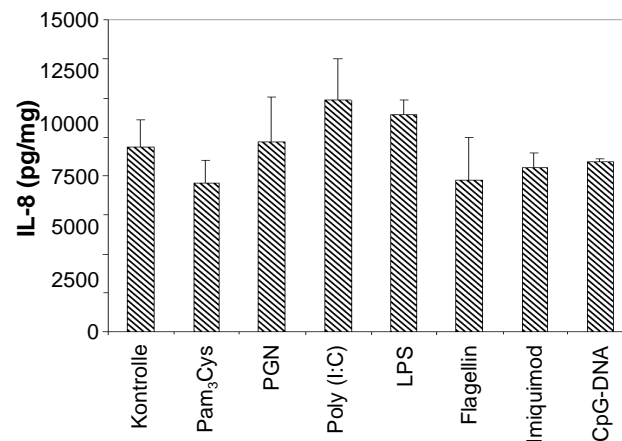


Abb. 20: IL-8-Sekretion aktivierter HDMEC (Zytokintriplett) nach Behandlung mit TLR-spezifischen Liganden. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ; 1000 U/ml je Zytokin) wurden die HDMEC für sechs Stunden mit den TLR-Liganden behandelt. Mittels eines Sandwich-ELISAs wurden die Mengen an freigesetztem IL-8 quantifiziert. Keiner der verwendeten Liganden führt zu einer höheren IL-8-Ausschüttung als die aktivierten Zellen ohne zusätzliche Liganden-Inkubation [n = 3 - 4].

Aktiviert man HDMEC nur mit zwei statt der drei Zytokine (IL-1 β und IFN- γ), so wird eine IL-8-Konzentration in den Zellkulturüberständen von 8563 ± 786 pg/mg Zellprotein gemessen. Der IL-8-Spiegel bleibt damit bei der Aktivierung mit dem Zytokindublett etwa 10 % unter dem Spiegel der Aktivierung durch das Zytokintriplett. Co-Inkubation des Zytokindubletts mit Poly(I:C) oder LPS führte dann zu einem signifikanten Anstieg der IL-8-Level (13118 ± 1868 pg/mg Zellprotein bzw. 12166 ± 457 pg/mg Zellprotein). Die anderen Liganden zeigten auch hier keinen weiteren Einfluss auf die IL-8-Freisetzung (Abb. 21).

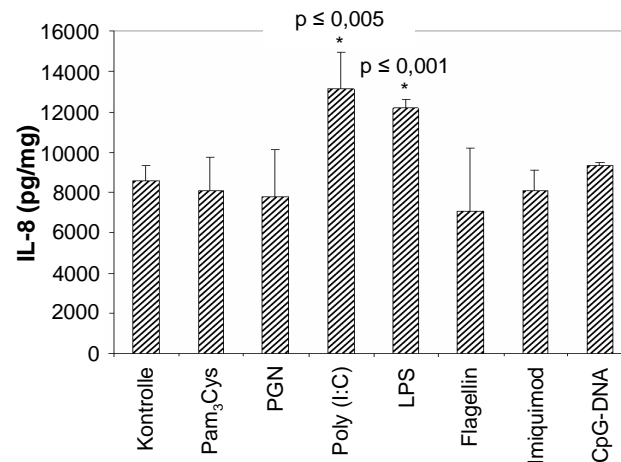


Abb. 21: IL-8-Sekretion aktivierter HDMEC (Zytokindublett) nach Behandlung mit TLR-spezifischen Liganden. HDMEC werden für 24 Stunden nur mit den beiden Zytokinen IL-1 β und IFN- γ (1000 U/ml je Zytokin) behandelt. Nach Zugabe TLR-spezifischer Liganden wird nach sechs Stunden die IL-8-Freisetzung mittels ELISA ermittelt. HDMEC produzieren signifikant höhere Mengen an IL-8 (Faktor 1,5 bzw. Faktor 1,4), wenn sie mit Poly(I:C) (TLR3-Ligand, 50 μ g/ml) oder LPS (TLR4-Ligand, 100 ng/ml) inkubiert werden. Alle anderen Liganden haben keinen Einfluss auf die IL-8-Ausschüttung durch primäre Endothelzellen [n = 3 - 4].

Der Einfluss verschiedener CpG-DNA-Konzentrationen wurde auch in aktivierten HMEC-1 untersucht. Dazu wurden die Zellen für 24 Stunden mit dem proinflammatorischen Zytokintriplett aktiviert und anschließend für sechs Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an CpG-DNA inkubiert.

Die Freisetzung von IL-8 aktivierter HMEC-1 variiert ebenfalls in Abhängigkeit der zur Inkubation der Zellen verwendeten CpG-DNA-Konzentrationen. Bei einer Konzentration von 10 μ M, also etwa dem 10-fachen der in den anderen Versuchen verwendeten Mengen, erreicht man auch bei aktivierten immortalisierten Endothelzellen eine um etwa 50 % reduzierte IL-8-Sekretion (Abb. 22).

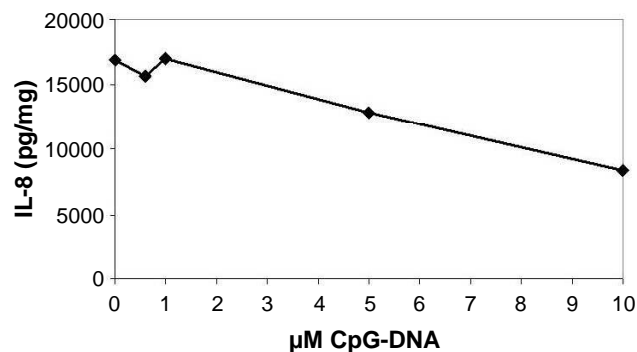


Abb. 22: Einfluss verschiedener CpG-DNA-Konzentrationen auf die IL-8-Sekretion aktivierter HMEC-1. Nach 6-stündiger Inkubation aktivierter HMEC-1 mit verschiedenen Konzentrationen an CpG-DNA (0 - 10 µM) wurden die in den Zellkulturüberständen enthaltenen IL-8-Mengen im ELISA quantifiziert. Eine deutliche Reduktion der IL-8-Sekretion von etwa 50 % kann nach Behandlung der Zellen mit 10 µM CpG-DNA beobachtet werden [n = 1].

3.2.2 TLR-spezifische Liganden modulieren die Expression der induzierbaren NO-Synthase in Endothelzellen

Um die Frage zu klären, ob die Expression der iNOS im Rahmen der Pathogenerkennung durch TLRs reguliert wird, wurden ruhende sowie mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ; 1000 U/ml je Zytokin) aktivierte immortalisierte und primäre Endothelzellen mit TLR-spezifischen Liganden (Pam₃Cys 5 µg/ml, LTA 10 µg/ml, PGN 25 µg/ml, Poly(I:C) 50 µg/ml, LPS 100 ng/ml, Flagellin 500 ng/ml, Imiquimod 10 µM, CpG-DNA 1 µM) für 24 Stunden inkubiert. Die Proben wurden für die PCR (zweistufige quantitative RT/real-time PCR für HMEC-1 und zweistufige quantitative RT/PCR für HDMEC) aufgearbeitet und die iNOS-mRNA detektiert.

Bei den ruhenden HMEC-1 findet man einen Basisspiegel an iNOS-Expression, der in der real-time PCR bei einer Templatmenge von 100 ng cDNA pro Reaktion einen C_T-Wert von 33,5 aufweist. Relativ zu dieser geringen Expression werden durch Behandlung der Zellen mit PGN, Flagellin und CpG-DNA signifikant niedrigere iNOS-Level erreicht. So unterschreiten die mit PGN behandelten Zellen die basale iNOS-Expression um den Faktor $0,56 \pm 0,27$, die mit Flagellin behandelten Zellen um den Faktor $0,42 \pm 0,12$ und die mit CpG-DNA behandelten Zellen um den Faktor $0,43 \pm 0,2$. Einzig die Behandlung der HMEC-1 mit Poly(I:C) führt zu einer signifikanten Steigerung der iNOS-Expression

um den Faktor $4,6 \pm 1,3$. Als Positivkontrolle diente die Aktivierung der Zellen mit dem proinflammatorischen Zytokintriplett, welches auch in der Literatur mit einer gesteigerten iNOS-Expression dokumentiert ist (45). Die Steigerung der iNOS-Expression beträgt den Faktor $7,1 \pm 2,5$ im Vergleich zu den ruhenden Zellen (Abb. 23).

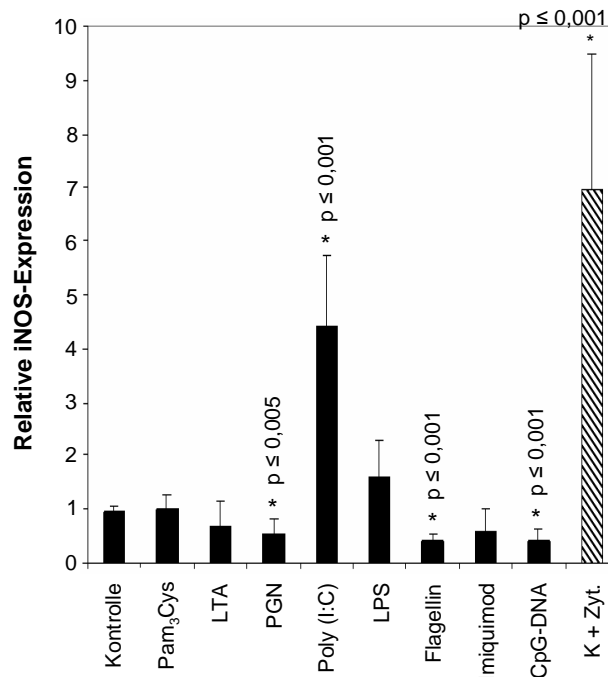


Abb. 23: Relative iNOS-Expression ruhender HMEC-1 nach Behandlung mit TLR-spezifischen Liganden. Nicht-voraktivierte HMEC-1 wurden für 24 Stunden mit TLR-spezifischen Liganden inkubiert. Die Zellen wurden lysiert, RNA isoliert und eine zweistufige quantitative RT/real-time PCR durchgeführt. Die Detektion der humanen iNOS ergibt in ruhenden HMEC-1 einen geringen Basislevel (C_T 33,5 bei 100 ng cDNA). Durch Inkubation der Zellen mit PGN (25 µg/ml, NOD1/NOD2-Ligand), Flagellin (500 ng/ml, TLR5-Ligand) und CpG-DNA (1 µM, TLR9-Ligand) wird dieser Basislevel unterschritten, und es zeigt sich eine signifikante Reduktion der iNOS-Expression (Faktor 0,56 für PGN, Faktor 0,42 für Flagellin und Faktor 0,43 für CpG-DNA). Die Behandlung der Zellen mit Poly(I:C) (50 µg/ml, TLR3-Ligand) hingegen führt zu einer signifikanten *de novo* iNOS-Expression (Faktor 4,6). Als Positivkontrolle werden proinflammatorisch aktivierte HMEC-1 verwendet [n = 3].

Ruhende HDMEC exprimieren ebenfalls basale Mengen an iNOS-mRNA, die am Detektionslimit der PCR liegen. Eine deutliche *de novo-Expression* der iNOS kann nach Behandlung der Zellen mit LPS, nicht jedoch mit Poly(I:C) wie bei der Endothelzelllinie, beobachtet werden. Dafür führt der TLR5-Ligand Flagellin zu einer Induktion der iNOS. Die Liganden Pam₃Cys, PGN, Imiquimod und CpG-DNA haben keinen Einfluss auf die

iNOS-Expression. Aktivierung der Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ; 1000 U/ml je Zytokin), ohne weitere Behandlung mit TLR-Liganden, führt zu einer starken Induktion der iNOS (Abb. 24).

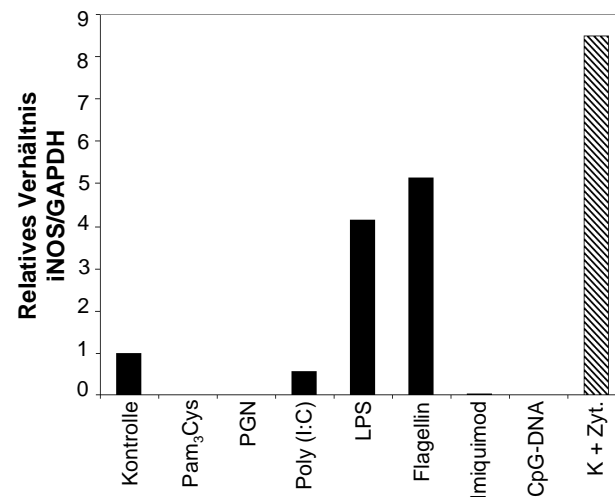


Abb. 24: Relative iNOS-Expression ruhender HDMEC nach Behandlung mit TLR-spezifischen Liganden. Ruhende HDMEC wurden für 24 Stunden mit den TLR-spezifischen Liganden inkubiert. Die Zellen wurden lysiert, RNA isoliert und eine zweistufige quantitative RT/PCR durchgeführt. Unbehandelte Zellen exprimieren iNOS-mRNA am Detektionslimit. Durch Behandlung der HDMEC mit den Liganden LPS und Flagellin findet man eine *de novo*-Expression der iNOS. Die anderen Liganden haben keinen Einfluss. Als Positivkontrolle werden Zytokin-aktivierte HDMEC untersucht [n = 1 - 4].

Bereits die Behandlung der HMEC-1 mit proinflammatorischen Zytokinen führte zu einer signifikanten Expressionssteigerung der iNOS (Abb. 19). Eine weitere signifikante Steigerung der iNOS-Expression kann nur mit den TLR-Liganden Pam₃Cys (Faktor $1,3 \pm 0,2$) und PGN ($1,53 \pm 0,4$) erreicht werden. Alle weiteren verwendeten Liganden haben keinen Einfluss auf die iNOS-Expression unter proinflammatorischen Bedingungen. Als Negativkontrolle werden ruhende HMEC-1 auf die iNOS-Expression hin untersucht (Abb. 25).

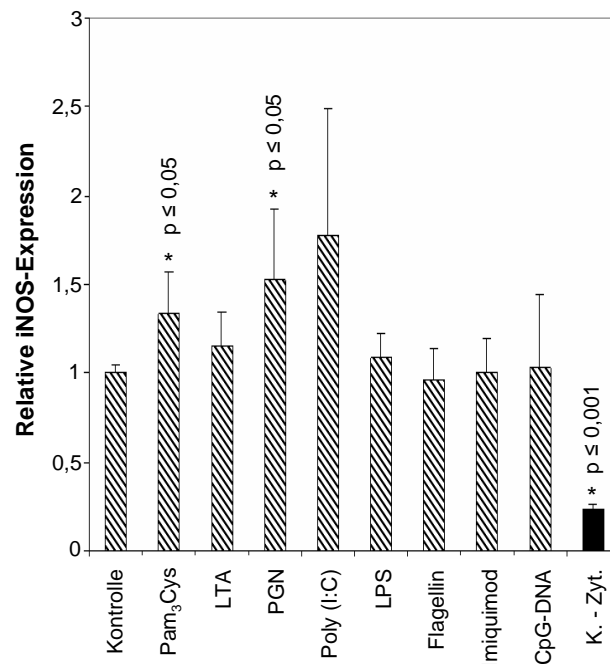


Abb. 25: Relative iNOS-Expression aktivierter HMEC-1 nach Behandlung mit TLR-spezifischen Liganden. Nach der 24-stündigen Inkubation mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ; 1000 U/ml je Zytokin; gestreifte Balken) wurden die HMEC-1 für weitere 24 Stunden mit TLR-spezifischen Liganden inkubiert. Die Zellen wurden lysiert, RNA isoliert und eine zweistufige quantitative RT/real-time PCR durchgeführt. Die Behandlung der Zellen mit Pam₃Cys und PGN führt zu einer signifikanten Expressionssteigerung der iNOS (Faktor 1,3 bei Pam₃Cys und Faktor 1,53 bei PGN). Die übrigen Liganden zeigen unter proinflammatorischen Bedingungen keine weitere Reaktion auf die iNOS-Expression. Der Anstieg der iNOS-Expression ist bei proinflammatorisch aktivierten Zellen im Vergleich zu den ruhenden HMEC-1 signifikant [n = 2 -3].

Auch bei den primären mikrovaskulären Endothelzellen kann die Induktion der iNOS durch 24-stündige Behandlung mit dem proinflammatorischen Zytokintripltet sowie eine weitere 24-stündige Inkubation mit den TLR-spezifischen Liganden weiter gesteigert werden. Alle Liganden außer Poly(I:C) führen zu einer Steigerung der iNOS-mRNA-Expression über das Level der ausschließlich mit Zytokinen behandelten Zellen hinaus. Die Expressionssteigerung der iNOS erreichte mit Pam₃Cys einen Faktor von 5,1, mit PGN einen Faktor von 4,5, mit LPS einen Faktor von 3,2, mit Flagellin einen Faktor von 3,7, mit Imiquimod einen Faktor von 3,1 und mit CpG-DNA einen Faktor von 4,0. Als Negativkontrolle wurden nicht-aktivierte Zellen mitgeführt (Abb. 26).

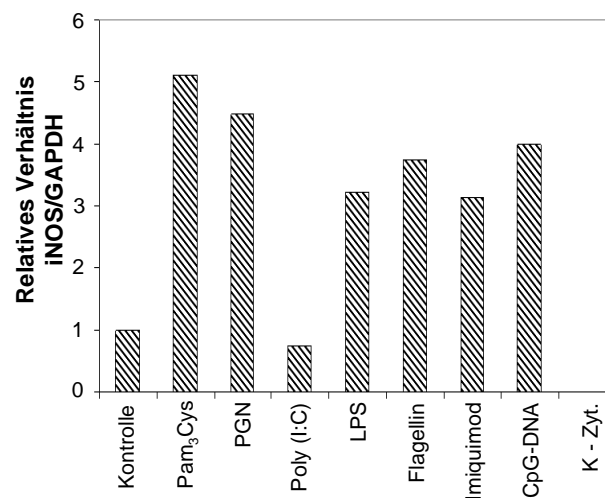


Abb. 26: Relative iNOS-Expression aktivierter HDMEC nach Behandlung mit TLR-spezifischen Liganden. HDMEC wurden für 24 Stunden mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ; 1000 U/ml je Zytokin) inkubiert. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Behandlung der Zellen mit TLR-spezifischen Liganden. Mit den aufgearbeiteten Proben wurde eine zweistufige quantitative RT/PCR durchgeführt. Bei den aktivierten HDMEC zeigt sich, außer mit Poly(I:C), eine deutliche Steigerung der iNOS-Expression mit allen verwendeten Liganden. Als Negativkontrolle werden ruhende HDMEC mitgeführt [n = 1].

Um die Expression der iNOS im Rahmen der TLR-Signalkaskade auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurden HMEC-1 für 24 und 48 Stunden mit Poly(I:C) in An- und Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine behandelt und in den Lysaten die Nitrosoverbindungen (RXNO) anhand des in der Reaktion der Chemilumineszenzdetektion (CLD) gemessenen Stickstoffmonoxids (NO) ermittelt. Für diesen Versuch wurde exemplarisch der Ligand Poly(I:C) ausgewählt, da mit diesem Liganden die höchste Expressionssteigerung der iNOS auf Genebene ermittelt wurde. Zum Nachweis, dass die gemessenen RXNO auch iNOS-abhängig sind, wurde der NOS-Inhibitor L-NIO verwendet und in Kombination mit proinflammatorischen Zytokinen eingesetzt.

Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) wurde ein Anstieg der RXNO vom Faktor 3,1 gemessen. Während proinflammatorische Zytokine alleine (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ; 1000 U/ml je Zytokin) in diesem Zeitraum zu keinem Anstieg der RXNO führen, kann der 4,4-fache Anstieg der RXNO gemessen werden, wenn die Zellen mit Zytokinen in Kombination mit Poly(I:C) inkubiert werden. Der NOS-Inhibitor L-NIO, der mit dem proinflammatorischen Zytokinriplett co-inkubiert wurde,

zeigte zu diesem Zeitpunkt keine Wirkung, da die proinflammatorischen Zytokine noch keine Antwort induziert haben (Abb. 27).

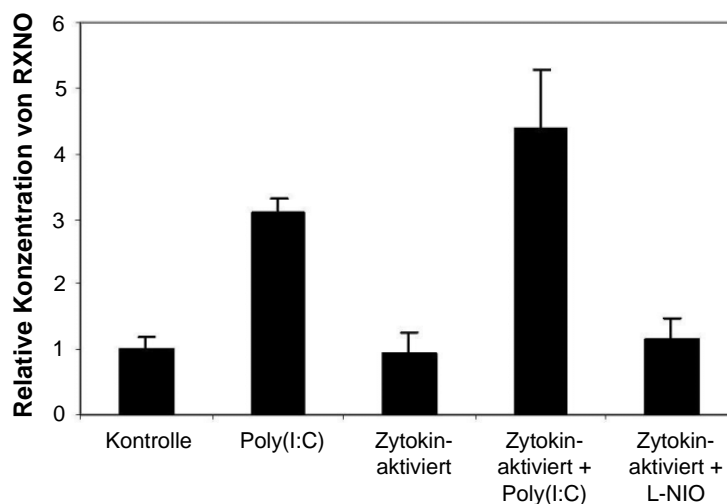


Abb. 27: Relative RXNO-Konzentrationen ruhender HMEC-1. HMEC-1 wurden für 24 Stunden mit Poly(I:C) in An- und Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine behandelt. Zur Kontrolle, ob der beobachtete Effekt auch iNOS-abhängig ist, wurden aktivierte Zellen mit dem NOS-Inhibitor L-NIO inkubiert. Nach Lyse und Ultraschallbehandlung der Zellen wurde die Menge an gebildetem RXNO mittels CLD ermittelt. Sowohl Poly(I:C) alleine als auch in Kombination mit proinflammatorischen Zytokinen führt zur Freisetzung von RXNO. In der frühen RXNO-Antwort führen proinflammatorische Zytokine alleine zu keinem Effekt. Die Standardabweichungen resultieren aus der Triplettmessung [n = 1].

Nach 48-stündiger Behandlung der HMEC-1 mit Poly(I:C) kann ein Anstieg der RXNO um den Faktor 10,6 im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. In diesem Zeitrahmen führte auch die Zytokin-Behandlung der Zellen zu einem Anstieg der RXNO um den Faktor 3,9. Die Co-Inkubation von proinflammatorischen Zytokinen und Poly(I:C) führte zu diesem späten Messzeitpunkt zu einem Anstieg der RXNO um den Faktor 6,8. Der NOS-Inhibitor inhibierte den NO-Effekt der proinflammatorischen Zytokine zu 100 %, das heißt, dass die beobachteten Effekte tatsächlich iNOS-abhängig sind (Abb. 28).

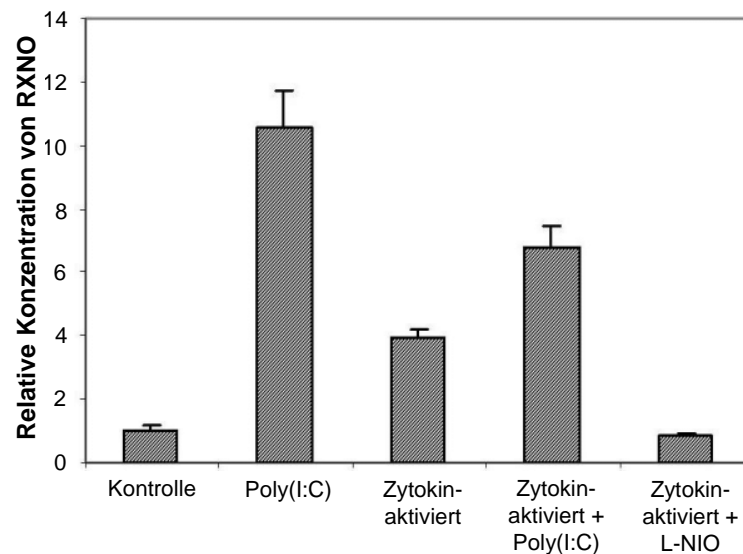


Abb. 28: Relative RXNO-Konzentrationen aktivierter HMEC-1. HMEC-1 wurden, wie in Abb. 24 beschrieben, behandelt. Die Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Substanzen erfolgt hier jedoch für 48 Stunden. Nach Aufarbeitung der Zellen wird die Menge an gebildetem RXNO bzw. in der Reaktion freigesetztem NO mittels CLD ermittelt. Poly(I:C) sowie das proinflammatorische Zytokintriplett alleine führen zu einer Induktion der iNOS. Interessanterweise ist der Effekt des Poly(I:C) in Anwesenheit der Zytokine nach 48 Stunden weniger stark ausgeprägt. Der iNOS-Inhibitor L-NIO zeigt, dass die RXNO-Antwort iNOS-abhängig ist. Die Standardabweichungen resultieren aus Triplettmessungen [$n = 1$].

3.2.3 Die Genexpression der TLRs ist iNOS-abhängig

Nachdem gezeigt wurde, dass die Pathogenerkennung durch TLRs Einfluss auf die iNOS-Expression hat, sollte geklärt werden, ob die iNOS-Expression bzw. das durch die iNOS freigesetzte Stickstoffmonoxid (NO) im Sinne eines Feedback-Mechanismus auch einen Einfluss auf die Expression der TLRs hat.

Dazu wurden HDMEC mit dem proinflammatorischen Zytokintriplett (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ; 1000 U/ml je Zytokin) für 24 Stunden inkubiert (was nachweislich einen Effekt auf die iNOS-mRNA-Expression hat; vgl. Abb. 24) und anschließend für weitere 24 Stunden mit dem NOS-Inhibitor L-NIO behandelt. Nach Aufarbeitung der Proben wurde eine zweistufige quantitative RT/real-time PCR durchgeführt. Dabei werden diejenigen TLRs untersucht, die zuvor eine signifikante Steigerung der TLR-Expression nach Zytokin-Aktivierung aufgewiesen hatten (vgl. Abb. 8).

Es zeigte sich, dass alle TLRs, die unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine eine signifikante Expressionssteigerung gezeigt hatten, unter dem Einfluss des NOS-Inhibitors eine deutlich reduzierte Expression, verglichen mit ihrem nicht-inhibierten Pendant, aufweisen (Kontrolle = 1). Das bedeutet, dass die Expressionssteigerung der Rezeptoren TLR2, TLR3 und TLR7, wie sie durch die Behandlung der Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen erreicht wurde, zum Teil durch das von der iNOS freigesetzte NO hervorgerufen wird. Die Expression des TLR10 wird nahezu vollständig über NO reguliert, da unter dem Einfluss des NOS-Inhibitors die TLR10-Expression annähernd wieder auf das Ausgangsniveau zurückgeht.

Die Regulation des TLR5 scheint einer negativen NO-abhängigen Regulation zu unterliegen, da proinflammatorische Bedingungen, die zur NO-Freisetzung führen, in einer Expressionsreduktion resultieren (Abb. 8). Allerdings ist dies nur schwer interpretierbar und muss noch gründlicher untersucht werden.

Nicht über NO reguliert ist die Expression des TLR8, da der NOS-Inhibitor keinen Einfluss auf die Expressionsstärke hat (Abb. 29).

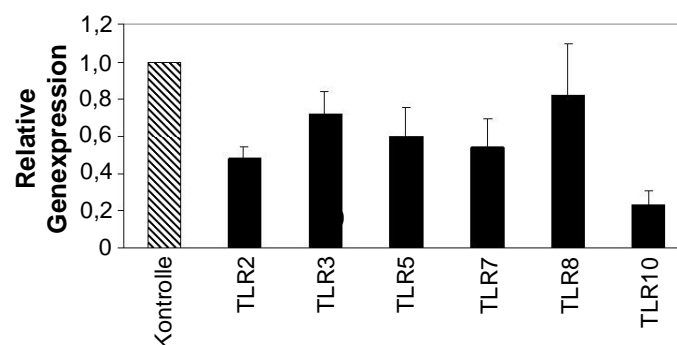


Abb. 29: Einfluss des NOS-Inhibitors L-NIO auf die TLR-Expression aktivierter HDMEC.

HDMEC wurden für 24 Stunden mit dem proinflammatorischen Zytokintriplett (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ; 1000 U/ml je Zytokin) inkubiert und weitere 24 Stunden mit dem NOS-Inhibitor L-NIO behandelt. Mit der isolierten mRNA wurde eine zweistufige quantitative RT/PCR durchgeführt. Untersucht wurden die TLRs, bei denen eine Expressionssteigerung bzw. *de novo*-Expression nach proinflammatorischer Zytokinbehandlung detektiert wurde (siehe Abb. 8). Durch die Behandlung der Zellen mit dem NOS-Inhibitor zeigt sich, dass die TLR-Expression auf mRNA-Ebene unterhalb der jeweiligen Kontrolle (TLR-Expression nach Zytokin-Aktivierung, Kontrolle = 1 für alle TLRs) bleibt. Die Standardabweichungen ergeben sich aus den Triplettmessungen [n = 1].

3.3 Untersuchungen zur Endotoxin-Kontamination der TLR-spezifischen Liganden

3.3.1 Einfluss von Polymyxin B auf das Aktivierungspotential von Endotoxin

Bei der Untersuchung von Entzündungsreaktionen müssen Kontaminationen der Zellkulturen mit ubiquitärem LPS/Endotoxin unbedingt ausgeschlossen werden, da LPS die entsprechende Signalkaskade aktiviert und die Ergebnisse verfälscht werden. Durch Behandlung der Zellkulturen bzw. der zu untersuchenden Zusätze mit Polymyxin B (PmB) wird eventuell vorhandenes Endotoxin irreversibel gebunden und verliert seine aktivierende Wirkung. Um zu ermitteln, welches die optimale Dosis an PmB zur Hemmung der LPS-Wirkung ist, wurden verschiedene LPS-Konzentrationen [a) verwendete LPS-Dosis in den Versuchen: 100 ng/ml, b) geringere Menge an LPS, die noch einen signifikanten Effekt auf die IL-8-Freisetzung hat und einen hohen Grad an "Kontamination" potentieller Liganden darstellt: 10 ng/ml, c) Kontrolle des PmB: 0 ng/ml LPS] mit verschiedenen PmB-Konzentrationen (0 - 30 µg/ml) inkubiert. Die Zellen wurden für eine 6-stündige Inkubation mit dem Ligand/PmB-Mix behandelt. Die Zellkulturüberstände wurden im IL-8-Sandwich-ELISA eingesetzt.

Zur Kontrolle, ob PmB alleine einen Einfluss auf die IL-8-Produktion der HMEC-1 hat, wurden die Zellen mit PmB in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Es zeigte sich, dass durch die Behandlung der Zellen mit PmB keine Veränderungen der IL-8-Sekretion auftreten.

Während 0,1 und 1 µg/ml PmB keinen Einfluss auf die Wirkung des LPS (weder bei 10 noch bei 100 ng/ml) haben, kann bei einer Menge von 10 µg/ml PmB eine Hemmung der Endotoxinwirkung sowohl bei 10 als auch bei 100 ng/ml um 83 bzw. 64 % beobachtet werden. Da auch bei höheren PmB-Konzentrationen keine deutliche Steigerung der inhibitorischen PmB-Wirkung beobachtet werden kann (Abb. 30), wurde in den folgenden Versuchen zur Überprüfung der Endotoxinkontamination der TLR-spezifischen Liganden eine Kombination von Ligand und PmB 10 µg/ml verwendet.

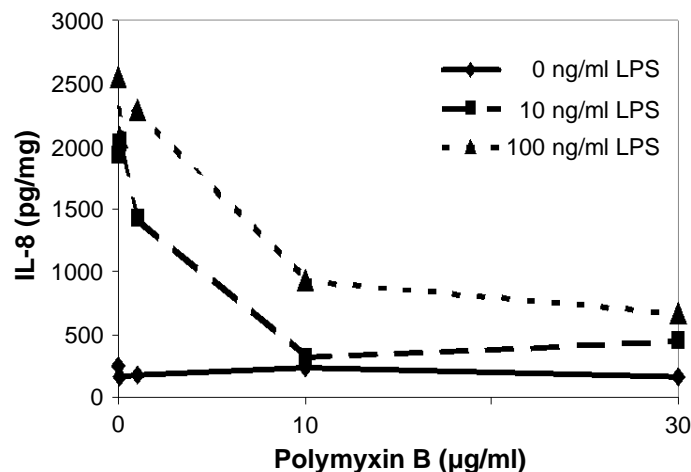


Abb. 30: Einfluss verschiedener LPS/Polymyxin B-Konzentrationen auf die IL-8-Sekretion ruhender HMEC-1. Die Kombination LPS/Polymyxin B wurde in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen bei 4 °C für eine Stunde inkubiert. Die Mixe wurden dann mit Zellkulturmedium auf die finalen Konzentrationen (LPS: 0, 10 und 100 ng/ml; Polymyxin B: 0, 0,1, 1, 10 und 30 µg/ml) verdünnt und die Zellen sechs Stunden damit behandelt. Die Ergebnisse der IL-8-Freisetzung zeigen, dass eine starke Hemmung des LPS-Effektes (100 ng/ml) durch 10 µg/ml Polymyxin B erreicht werden. Die nahezu vollständige Hemmung wird mit 10 µg/ml Polymyxin B in Anwesenheit von 10 ng/ml LPS erreicht [n = 2 - 4].

3.3.2 Überprüfung der verwendeten TLR-Liganden durch Co-Inkubation mit Polymyxin B

Die verschiedenen TLR-spezifischen Liganden wurden in Form einer Stammlösung mit und ohne PmB co-inkubiert. Für sechs Stunden wurden die Zellen mit den Kombinationen behandelt und die Zellkulturüberstände im IL-8-Sandwich-ELISA eingesetzt.

In ruhenden HMEC-1, die mit einer Kombination aus Endotoxin-freiem Wasser mit und ohne PmB behandelt wurden, ist zu sehen, dass PmB keinen Einfluss auf die IL-8-Produktion der Zellen hat. Mit dem Ergebnis wird weiter bestätigt, dass das Wasser, welches zum Lösen der lyophilisierten TLR-Liganden verwendet wurde, Endotoxin-frei ist und eine etwaige Kontamination vom jeweiligen Liganden und nicht vom Lösungsmittel abhängig ist.

Der Vergleich der IL-8-Freisetzung der mit den spezifischen TLR-Liganden in An- oder Abwesenheit von mit PmB behandelten HMEC-1 zeigte, dass die Liganden nicht mit Endotoxin kontaminiert sind. Die IL-8-Freisetzung ist bei den mit und ohne PmB

behandelten Zellen gleich. Als Positivkontrolle wurde der Ligand LPS (10 ng/ml) mitgeführt, der wie erwartet bei Co-Inkubation mit PmB eine signifikante Reduktion der Endotoxinwirkung bewirkt (Abb. 31).

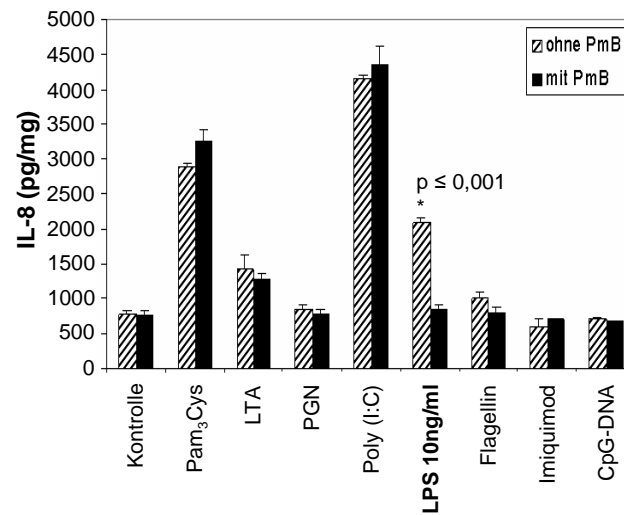


Abb. 31: Überprüfung der TLR-Liganden auf Endotoxin-Kontamination. Die verschiedenen TLR-spezifischen Liganden wurden mit PmB für eine Stunde bei 4 °C vorinkubiert. Die Zellen wurden dann für sechs Stunden mit den Liganden-Polymyxin B-Mixe behandelt und die IL-8 Freisetzung im Sandwich-ELISA ermittelt. Es zeigt sich, dass alle in den Versuchen verwendeten Liganden Endotoxin-frei sind. Als Positivkontrolle wird LPS 10 ng/ml verwendet [n = 2 - 4].

3.4 Expression eines TLR7-Pseudogens auf primären Endothelzellen

Zunächst wurde die TLR7-Expression in HDMEC mit Primern charakterisiert, die im offenen Leseraster des Gens liegen. Die Primersequenzen dafür wurden aus den Arbeiten von Zarembek und Godowski entnommen (89).

Im Verlauf der Arbeit wurden die Primersequenzen für die Real-time PCR wiederholt mit den Nukleotidsequenzdaten in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/) abgeglichen. Dies sollte der Kontrolle dienen, ob nicht noch zwischenzeitlich andere Gene mit den gleichen kurzen Sequenzabschnitten identifiziert wurden. Gleichzeitig sollten Sequenzfehler beim Bestellen der Oligonukleotide vermieden werden.

Bei den Homologieabgleichen zeigte sich dann, dass neben dem TLR7-Gen (NM_016562) ein TLR7-Pseudogen (NG_001066) existiert, welches ebenso von dem verwendeten Primerpaar erkannt wird. Die Sequenzen des TLR7-Gens und des TLR7-Pseudogens weisen eine sehr hohe Homologie auf, die Gensequenz ist zu 99 % identisch. Abweichend vom echten TLR7-Gen zeigte das Pseudogen jedoch ein Fehlen des Start-ATGs sowie einen Basenaustausch im vorderen Genabschnitt, welcher zu einem Austausch der Aminosäure Glutamin durch Leucin führt (Abb. 32).

LOCUS NM_016562 4992 bp mRNA linear PRI 23-OCT-2006
 DEFINITION **Homo sapiens toll-like receptor 7 (TLR7)**, mRNA.
 ACCESSION NM_016562
 VERSION NM_016562.3 GI:67944638

1 *gaagactcca gatataggat cactccatgc catcaagaaa gttgatgcta ttgggccc*
 61 *ctcaagctga tcttggcacc tctcatgctc tgctctctt caaccagacct ctacattcca*
 121 *ttttggaa*ga agactaaaa **tggtg****tttcc** **aatgtggaca ctgaaga**gac **a**aattcttat
 181 cctttttaac ataatcctaa tttccaaact ccttggggct agatggtttc ctaaaactct
 241 gccctgtgat gtcactctgg atgttccaaa gaacatgtg atcgtggact gcacagacaa
 301 gcatttgaca gaaattcctg gaggtattcc cacgaacacc acgaacctca ccctcaccat
 361 taaccacata ccagacatct cccagcgtc ctttcacaga ctggaccatc tggtagagat
 421 cgatttcaga tgcaactgtg tacctattcc actgggggtca aaaaacaaca tgtgcatcaa
 481 gaggctgcag attaaacca gaagctttag tggactcact tatttaaat ccctttacct
 541 ggatggaaac cagctactag agataccgca gggcctccc cctagcttactaa

LOCUS NG_001066 3481 bp DNA linear CON 19-SEP-2006
 DEFINITION **Homo sapiens toll-like receptor 7-like (TLR7-like) pseudogene on chromosome X.**
 ACCESSION NG_001066
 VERSION NG_001066.1 GI:42415476

1 *tatttttaaa atgttgcaaa agagaggcag caaatgggaa tttttaattc tgattcttgg*
 61 *tatgttttag aacaatgatt tgttctttct tatactttca ggtg**tttcca atgtggacac**
 121 **tgaaga**gac**a** aattcttatc ctttttaaca taatcctaata ttccaaactc cttggggcta
 181 gatggtttcc taaaactctg ccctgtgatg tcaactctgga tgttccaaag aacctatgta
 241 tcgtggactg cacagacaag catttgacag aaattcctgg aggtattccc acgaacacca
 301 cgaacctcac cctcaccatt aaccacatac cagacatctc cccagcgtcc tttcacagac
 361 tggaccatct ggtagagatc gatttcagat gcaactgtgt acctattcca ctgggggtcaa
 421 aaaacaacat gtgcatcaag aggctgcaga ttaaaccag aagctttagt ggactcactt
 481 atttaaaatc cctttacctg gatggaaacc agctactaga gataccgacg ggcctcccgc
 541 ctagcttac.taa*

Abb. 32: Auszüge der Sequenzen TLR7 [NM_016562] und Pseudogen-TLR7 [NG_001066] aus NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Kursiv und grau: Sequenz vor dem Start-ATG bzw. vor der homologen TLR7-Sequenz; Rot hinterlegt: (echtes) Start-ATG. Das ATG fehlt dem Pseudogen.; Unterstrichen: 99 %-ige Homologie zwischen TLR7 und Pseudogen-TLR7; Blau hinterlegt: Einziger Basenaustausch in der ansonsten homologen Sequenz, der zum Austausch einer Aminosäure führt (TLR7: Glutamin, Pseudogen-TLR7: Leucin). Gelb hinterlegt: Die unterschiedlichen Sense-Primer für TLR7 und TLR7-Pseudogen. Grün hinterlegt: Für beide Sequenzen identische Antisense-Primer.

Um zu verifizieren, dass die anfänglich beobachteten Expressionen bzw. Expressionssteigerungen tatsächlich vom "echten" TLR7-Gen stammen (Abb. 2 - 5, 7, 8, 10, 11 und 26), wurden neue Primersequenzen bestimmt, wobei die Lage des Sense-Primers jetzt außerhalb des offenen Leserasters, das heißt "vor" dem Start-ATG am 5'-Ende der mRNA-Sequenz, liegt. In der gleichen Weise wurde zur Kontrolle auch ein Sense-Primer für das TLR7-Pseudogen bestimmt. Die Lage des Antisense-Primers wurde für beide PCR-Ansätze identisch, innerhalb der Gensequenz, festgesetzt.

Zur Überprüfung der relevanten Primer bei primären Endothelzellen wurden die Proben der UVB-Versuche (Abb. 9 und 10) herangezogen. Normiert wird jeweils auf die Expression, die mit den Oligonukleotiden "TLR7 interne Primer" bei unbestrahlten Zellen erreicht wurde (Kontrolle = 1).

Es ist deutlich zu sehen, dass sowohl bei ruhenden als auch aktivierten unbestrahlten Endothelzellen, unabhängig vom Primerpaar, eine gleichbleibende TLR-Expression gemessen wird. Unter dem Einfluss von UVB-Strahlung (5 oder 25 mJ/cm²) sieht man jedoch sowohl bei nicht-aktivierten als auch aktivierten Proben Unterschiede in der TLR-Expression, die allerdings hohen Standardabweichungen unterliegen. Es ist auffällig, dass auch die Expression des TLR7-Pseudogens auf mRNA-Ebene einer geringen differenziellen Modulation unterliegt und dass die Detektion des echten TLR7-Gens als auch des TLR7-Pseudogens mit dem internen Primerpaar die Ergebnisse mehr oder weniger stark verfälscht. Die Expression sowie die Expressionsmodulation des echten TLR7-Gens fällt in der Praxis geringfügig schwächer aus (Abb. 33).

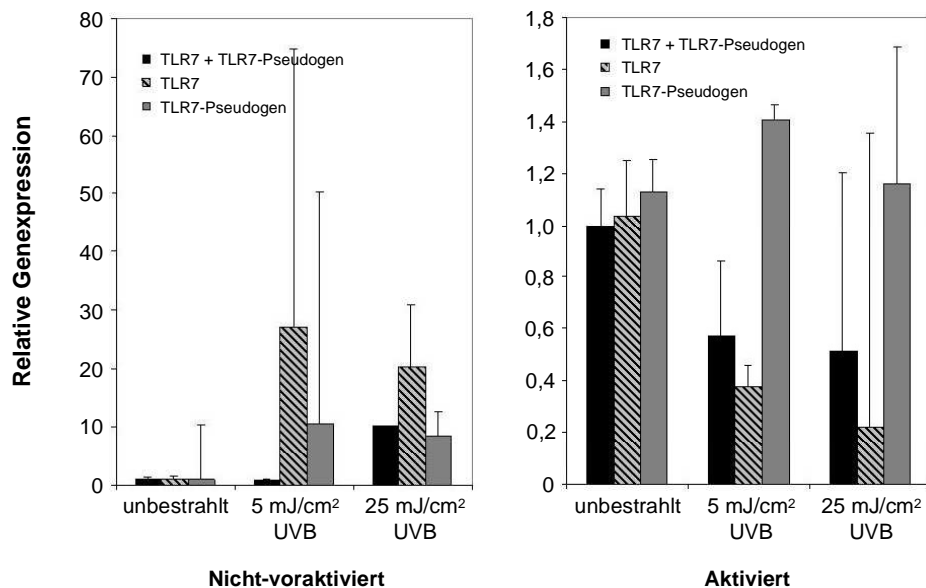


Abb. 33: Relative Genexpression des echten TLR7 und des TLR7-Pseudogens bei HDMEC. Ruhende und mit proinflammatorischen Zytokinen aktivierte HDMEC wurden mit verschiedenen UVB-Dosen bestrahlt. Nach 18 Stunden wurden die Zellen lysiert und die isolierte RNA wird in der zweistufigen quantitativen RT/real-time PCR mit verschiedenen Primerpaaren zur Detektion eingesetzt. Während die unbestrahlten Zellen eine große Konstanz bezüglich ihrer TLR-Expression aufzeigen, können bei den mit UVB-bestrahlten Proben deutliche Unterschiede in der Expression beobachtet werden. Normiert wurde jeweils auf die unbestrahlte Probe mit dem Primerpaar, welches TLR7 und Pseudogen detektiert [n = 2 - 3].

Da sich die Entdeckung des Pseudogen erst im Verlauf der Arbeit herausgestellt hat, konnte die veränderte (externe/interne) Primerwahl nur bei den UVA-Versuchen angewandt werden. Alle anderen Versuche, die die Expression des TLR7 betreffen, wurden mit dem Primerpaar durchgeführt, das beide Gene detektiert.

Um die Existenz eines funktionellen TLR7-Pseudogens auch in immortalisierten Endothelzellen nachzuweisen, wurde RNA sowohl aus ruhenden als auch mit proinflammatorischen Zytokinen aktivierten HMEC-1 isoliert und eine zweistufige quantitative RT/real-time PCR durchgeführt.

Da in HMEC-1 keine Expressionssteigerung des TLR7-Pseudogens durch Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen hervorgerufen werden kann (Faktor von 1,5) und das externe/interne Primerpaar zu großen Standardabweichungen der TLR-Expression führt, wurde für alle PCR-Versuche mit HMEC-1 das interne TLR7-Primerpaar verwendet (Abb. 34).

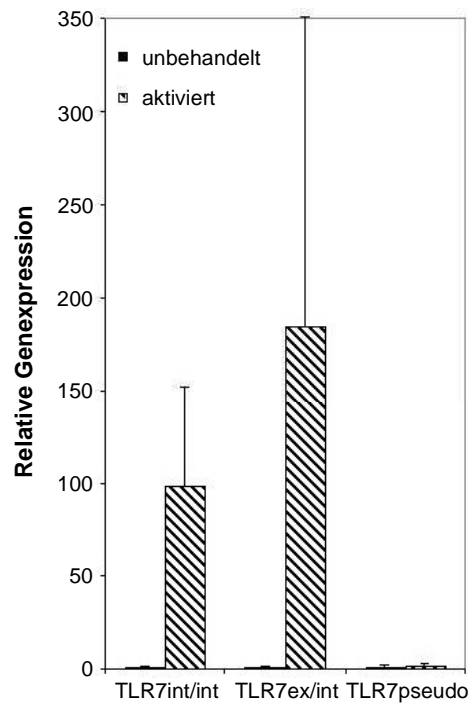


Abb. 34: Relative Genexpression des echten TLR7 und des TLR7-Pseudogens bei HMEC-1. HMEC-1 wurden für 18 Stunden mit proinflammatorischen Zytokinen stimuliert und die isolierte RNA wird einer zweistufigen quantitativen RT/real-time PCR unterzogen. Als Primer wurden die verschiedenen Oligonukleotidpaare verwendet, die unterschiedliche Genabschnitte detektieren bzw. zwischen dem echten TLR7-Gen und dem TLR7-Pseudogen differenzieren. In HMEC-1 kann kein auf mRNA-Ebene reguliertes TLR7-Pseudogen detektiert werden [n = 2 - 3].

4 Diskussion

4.1 Endothelzellen als geeignetes Zellkulturmodell

Im Rahmen der Pathogen-assoziierten molekularen Mustererkennung (PAMP, pathogen-associated molecular patterns) wurden sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, pathogen recognition receptors) des natürlichen Immunsystems identifiziert, die konservierte Strukturen der Erreger erkennen und dadurch die Entzündungsreaktion in Gang setzen. Als Hauptvertreter dieser Rezeptoren werden die Toll-like Rezeptoren (TLRs) angesehen (1). Um die Immunfunktion der Haut weiter aufzuklären, wurde in der vorliegenden Arbeit die TLR-Expression und ihre Funktionalität auf dermalen mikrovaskulären Endothelzellen untersucht, da diese Zellart aufgrund ihrer lokalen Disposition und ihren bisher bekannten funktionellen Eigenschaften als Effektorzelle im Entzündungsprozess eine potentielle Basis für eine direkte Beteiligung an der Funktion des natürlichen Immunsystems mitbringt.

Zur Charakterisierung der TLR-Expression wurden sowohl primäre als auch immortalisierte Endothelzellen untersucht. Die primären, dermalen, mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) wurden aus Vorhautgewebe isoliert und sind kommerziell erhältlich. Sie stellen ein geeignetes *in vitro* Modell dar, da sie aufgrund ihrer Lokalisation im Hautgewebe theoretisch allen hier verwendeten proinflammatorischen Stimuli (Zytokine, UV-Bestrahlung und TLR-Liganden) und Bakterienstrukturen (Pam₃Cys, PGN, Poly(I:C), LPS, Flagellin, Imiquimod und CpG-DNA) *in vivo* zugänglich sind. Außerdem weisen die in Kultur gehaltenen primären Endothelzellen weitestgehend alle bekannten Endothelzeleigenschaften auf, die auch für Endothelzellen in Hautmodellen nachgewiesen werden konnten (93). Da Untersuchungen mit primären Endothelzellen jedoch zum Teil große Schwierigkeiten (Isolierung reiner Kulturen, anspruchsvolle Kulturbedingungen und stark begrenzte Lebensdauer in Kultur, häufiger Wechsel der Donoren und damit ständig wechselnde genetische Voraussetzungen) aufweisen, wurden in dieser Arbeit zusätzlich immortalisierte Endothelzellen (HMEC-1) verwendet, die aufgrund der bei ihrer Generierung gewonnenen Eigenschaften die Problematik der primären Zellen deutlich einschränken (51). Da allerdings durch den Immortalisierungsprozess der Zellstoffwechsel der HMEC-1 gegenüber den HDMEC verändert wurde, wurde jedes Ergebnis der Zelllinie mit den primären Endothelzellen

verifiziert. Der Vergleich der Ergebnisse - Zelllinie *versus* primäre Zellen - zeigt, dass zwar einige Unterschiede zwischen den Zelltypen vorliegen, sie jedoch grundsätzlich nicht verschieden sind.

4.2 TLR-Expression auf humanen Endothelzellen

4.2.1 TLR-Expression auf ruhenden Endothelzellen

In Ergänzung zu den von Morris *et al.* (2006), Faure *et al.* (2000) und Li *et al.* (2004) auf humanen Endothelzellen identifizierten TLRs 2, 3, 4 und 9 konnten im Rahmen dieser Arbeit weitere TLRs in Endothelzellen auf Expressions- sowie Aktivitätsebene charakterisiert werden (39-41). In ruhenden Endothelzellen wurden zusätzlich die Rezeptoren TLR1, TLR5 und TLR6 exprimiert. Immortalisierte Endothelzellen exprimieren außerdem den TLR10. Die meisten TLRs werden sowohl auf primären als auch auf immortalisierten Endothelzellen in ähnlicher Stärke exprimiert. Ausnahmen bilden hier nur die TLRs 1, 2 und 4. Von diesen liegt zwischen 5- und 20-mal mehr RNA in den Zellen vor.

4.2.2 Modulation der TLR-Expression bei Zytokine-aktivierten Endothelzellen

Simuliert man einen natürlichen Entzündungsprozess, wie er zum Beispiel bei der Wundheilung vorliegt, durch die Anwesenheit des proinflammatorischen Zytokintripletts IL-1 β , TNF- α und IFN- γ in der Zellkultur, so zeigen primäre Endothelzellen nach 18-stündiger Inkubation eine signifikante Erhöhung der TLR1-, TLR2- und TLR3-Expression, interessanterweise eine signifikante Expressionsreduktion des TLR5 sowie eine *de novo*-Expression der TLRs 7, 8 und 10. Die Rezeptoren TLR4, TLR6 und TLR9 werden nicht über den Signalweg der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und/oder IFN- γ reguliert. Bei der immortalisierten Endothelzelllinie HMEC-1 kann eine ähnliche Expressionsmodulation wie bei den primären Endothelzellen beobachtet werden. Korrespondierend zu den HDMEC findet man in HMEC-1 eine Expressionssteigerung des TLR2 und des TLR3 sowie eine *de novo*-Expression der Rezeptoren TLR7 und TLR8.

Überraschenderweise wird bei der Endothelzelllinie der TLR6 unter dem Einfluss des proinflammatorischen Zytokintripletts auf mRNA-Ebene herunterreguliert und nicht TLR5, wie in primären Endothelzellen. Zusätzlich zu den konstitutiv exprimierten TLRs 4, 6 und 9 der primären Zellen wird TLR1 und TLR10 konstitutiv auf HMEC-1 exprimiert.

Betrachtet man sowohl in immortalisierten als auch in primären Endothelzellen die relativen Expressionen der TLRs 1, 2 und 6 unter dem Gesichtspunkt der publizierten Heterodimerbildung zwischen TLR1/2 und TLR2/6, so fällt auf, dass die Expression des TLR2 alleine deutlich stärker ausfällt als die Summe der relativen Genexpressionen der TLRs 1 und 6. Eine Antwort dazu in der Literatur zu finden fällt schwer, da die Dimerbildung von mehreren Arbeitsgruppen kontrovers diskutiert wird, und es bislang keine eindeutigen Antworten gibt. Während einige Autoren ausschließlich die Heterodimerbildung zwischen TLR1/2 und TLR2/6 beschreiben (1, 94), sprechen andere Autoren auch über die Homodimerbildung von TLR2 sowie über eine Heterodimerbildung des TLR2 mit anderen TLRs (8). Jedoch ist bis heute kein TLR2/TLR2-Ligand bzw. TLR2/TLRx-Ligand identifiziert worden, um die These der Dimerbildung zu verifizieren. Auch existieren keine Proteinstrukturdaten, die diese These stützen würden. Die Ergebnisse der Genexpressionsstudien dieser Arbeit sprechen allerdings dafür, dass neben der bekannten Heterodimerbildung noch weitere Möglichkeiten zur Komplexbildung für den TLR2 existieren. Als weitere Ursachen der hohen TLR2-Transkription sind außerdem eine nicht-quantitative Translation von TLR2-mRNA in Protein oder weitere Funktionen der TLR2-mRNA in der Zellphysiologie vorstellbar. Ferner wird von LeBouder *et al.* (2003) eine posttranslationale Modifikation des transmembranen TLR2-Proteins zu einer prozessierten löslichen Form beschrieben ("soluble TLR2"), welche in humanem Blutplasma gefunden wurde (95).

Die große Bandbreite der auf Endothelzellen exprimierten TLR-Gene sowie deren differentielle Modulation durch verschiedene proinflammatorische Stimuli bilden eine gute Basis für eine effektive Abwehr gegen verschiedenste Erregertypen. Dennoch muss für eine wirksame Immunabwehr verifiziert werden, ob die verschiedenen TLRs auch auf Proteinebene exprimiert werden und ob sie funktionell aktiv sind. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Funktionsstudien mit bakteriellen, viralen oder auch synthetischen Stimuli durchgeführt.

4.3 TLR-spezifische Liganden lösen eine Immunantwort auf Endothelzellen aus

4.3.1 TLRs werden funktionell auf humanen Endothelzellen exprimiert

Die Behandlung der primären und immortalisierten Endothelzellen mit TLR-spezifischen Liganden führt zu einer funktionellen Expression der entsprechenden Rezeptoren bei beiden Endothelzellarten. Zum Nachweis der Funktionalität wurden entsprechend der TLR-Signalkaskade die Parameter IL-8-Sekretion und iNOS-Expression bzw. Bildung und Freisetzung von RXNO gewählt, sie stellen potente Marker der Endothelzellaktivierung im Entzündungsprozess dar (70, 96-99).

Die Einordnung der Ergebnisse kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Zum einen ist die Charakterisierung der Rezeptorfunktionalität durch die entsprechenden Signalkaskaden, die durch die spezifischen Ligand/Rezeptor-Bindungen ausgelöst werden, möglich. Dabei führen die Liganden bei der Aktivierung ihres korrespondierenden TLRs entweder a) zur Veränderung der IL-8-Freisetzung sowie zur iNOS-Expression (Pam₃Cys: TLR1/2, Poly(I:C): TLR3, LPS: TLR4, Flagellin: TLR5, Imiquimod: TLR7 und CpG-DNA: TLR9) oder b) nur zur Veränderung der IL-8-Freisetzung (LTA: TLR2). Eine Veränderung der iNOS-Expression (ohne Involvierung von IL-8) ist nur mit PGN, wahrscheinlich durch Bindung der entsprechenden Rezeptoren NOD1/NOD2, möglich.

Zum anderen kann eine Einteilung anhand der Funktionalität der primären und immortalisierten Endothelzellen erfolgen. Sie sind entweder i) sowohl im ruhenden als auch im aktivierten Zustand funktionell aktiv (Pam₃Cys, PGN, Poly(I:C), LPS, Flagellin und CpG-DNA), sie sind ii) nur in Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine funktionell aktiv (Imiquimod) oder sie sind iii) nur im ruhenden Zustand funktionell aktiv (LTA). Insgesamt weisen beide Endothelzellarten eine große Ähnlichkeit bezüglich ihrer TLR-Expression und Funktionalität auf. Geringe Abweichungen in der Antwort zwischen den beiden Endothelzellarten ergeben sich vermutlich durch den Immortalisierungsprozess bei der Herstellung der Endothelzelllinie (mögliche Veränderung verschiedener physiologischer Abläufe), durch die Differenz zwischen Substratkonzentration und Zellzahl oder durch unterschiedliche Rezeptordichten bei den beiden Endothelzellarten.

Eine Veränderung der Zellphysiologie durch den Immortalisierungsprozess kommt vermutlich bei der Signalkaskade des TLR4 zum Tragen. Hier ist, obwohl die durch LPS- ausgelöste Entzündungsreaktion zu den stärksten hier gemessenen Signalen gehört, eine deutliche Differenz zwischen primären und immortalisierten Zellen zu beobachten. Dabei führt die Behandlung der Zellen mit LPS zur Freisetzung von IL-8 in beiden Endothelzelltypen, jedoch nur in primären Endothelzellen zur iNOS-Aktivierung, obwohl der entsprechende Ligand TLR4 auf Genebene sowohl in ruhenden als auch aktivierten Zellen in einer identischen Stärke exprimiert wurde. Damit ergibt sich ein großer Unterschied zwischen der frühen (große Übereinstimmung bei der IL-8-Freisetzung) und der späten (wenig Übereinstimmung bei der iNOS-Expression) Immunantwort.

Der bei der Behandlung der primären Endothelzellen mit CpG-DNA hervorgerufene Effekt, nämlich ein Absinken der IL-8-Sekretion unter den basalen Spiegel, konnte bei immortalisierten Zellen zunächst nicht beobachtet werden. Um zu überprüfen, ob sich die IL-8-Antwort der HMEC-1 bei höheren CpG-DNA-Konzentrationen verändert, wurden immortalisierte Endothelzellen mit unterschiedlichen CpG-DNA-Konzentrationen (0,1 - 10 μM) behandelt (100). Dabei zeigte sich, dass in HMEC-1 Konzentrationen von mehr als 1 μM notwendig sind, um den Effekt einer reduzierten IL-8-Sekretion hervorzurufen, ein Effekt der bei HDMEC aber bereits mit 1 μM zu signifikanten Ergebnissen führte. Dieser Zusammenhang gilt sowohl für ruhende als auch proinflammatorisch voraktivierte Zellen. Ein möglicher Grund für dieses Phänomen liegt beim Immortalisierungsprozess zur Herstellung der Zelllinie. Dabei kommt es zu Veränderungen der Zellphysiologie, die Einfluss auf die Rezeptorausstattung der Zellen haben kann und oft mit einer geringeren Rezeptordichte auf der Zelllinie einhergeht. Außerdem kann sich das CpG-DNA-Transportersystem verändert haben, welches notwendig ist, um die CpG-DNA zu den auf den Endosomen lokalisierten TLR9 zu transportieren.

Bei den Ergebnissen zur Funktionalität ist außerdem auffällig, dass die Antwort der Endothelzellen neben einer gesteigerten IL-8- bzw. iNOS-Antwort auch aus einer reduzierten Freisetzung von IL-8 sowie aus einer iNOS-Expression unterhalb der basalen Spiegel bestehen kann. Dieser Effekt konnte mit den Liganden Flagellin (iNOS in nicht-aktivierten HMEC-1) und Imiquimod (IL-8 in aktivierten HMEC-1) sowie PGN, dem Liganden von NOD1/NOD2 (iNOS in nicht-aktivierten HMEC-1), und am eindruckvollsten

mit CpG-DNA (IL-8 in nicht-aktivierten HDMEC sowie iNOS in nicht-voraktivierten HMEC-1) beobachtet werden.

Der Effekt der signifikant supprimierten IL-8-Antwort durch stimulatorische CpG-DNA bei beiden Endothelzellarten ist auch deshalb interessant, da diese CpG-DNA bislang immer, dem Namen folgend, stimulierende Antworten zur Folge hatte. So hat auch dieselbe Sequenz, wie die in dieser Arbeit verwendete, auf Neutrophile eine stimulierende und ebenfalls konzentrationsabhängige Wirkung auf die IL-8-Freisetzung (100). In weiteren Studien wurden auch andere Zellarten charakterisiert, und es wurden zum Teil auch andere Nachweismethoden verwendet, jedoch alle mit einem immunstimulatorischen Ergebnis (101-105). Dennoch scheint es so, dass verschiedene stimulatorische CpG-DNA-Sequenzen in Endothelzellen eine Immunantwort auslösen können, die verschieden ist zu der Immunantwort anderer Zellarten. Diese These wird durch Ergebnisse in der Publikation Wingender *et al.* (2006) gestützt, die ebenfalls eine stimulatorische CpG-DNA-Sequenz verwendeten. Wird diese CpG-DNA systemisch in Mäuse injiziert, wobei die Nukleotidsequenz dadurch primär Kontakt zu Endothelzellen hat, so zeigt sich eine Unterdrückung der T-Zell-Antwort. Wenn die gleiche CpG-DNA subkutan in die Mäuse injiziert wird und die Sequenz mit anderen Gewebezellen (außer Endothelzellen) Kontakt hat, findet eine Immunreaktion in Form der antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung statt. Das bedeutet, dass, wenn CpG-DNA als potenter Stimulus des natürlichen und adaptiven Immunsystems bei Impfungen als Adjuvanz eingesetzt werden soll (Phase III klinische Studien laufen bereits) (28), dem Applikationsort eine besondere Bedeutung zukommt und damit der Verlauf der Immunantwort maßgeblich beeinflusst wird (106).

Um zu überprüfen, ob die Steigerungen der iNOS-Expression auf mRNA-Ebene auch auf Proteinebene zu finden sind und ob die Liganden auch einen echten Effekt auf die NO-Freisetzung in der Zelle haben, wurde exemplarisch der am stärksten das iNOS-Gen induzierende TLR3-Ligand Poly(I:C) gewählt, und es konnten mittels Chemilumineszenz die vermehrte Bildung von RXNO in der Zelle detektiert werden (77). Dabei zeigte sich, dass Poly(I:C) eine stärkere Wirkung auf die iNOS-vermittelte NO-Freisetzung hat als die üblichen Induktoren der humanen iNOS, die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ (70). Ferner konnte gezeigt werden, dass Poly(I:C) eine schnelle Immunantwort innerhalb von 24 Stunden auslöst, während die Anwesenheit

proinflammatorischer Zytokine zu einem späten Signal nach etwa 48 Stunden führt. Diese Beobachtung unterstützt die anfängliche Aussage über das angeborene Immunsystem, dass das Eindringen von Pathogenen einer schnellen Immunantwort bedarf, um die Verbreitung der sich schnell vermehrenden Erreger einzudämmen. Die Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine wird dann erst für die Unterhaltung der Entzündungsreaktion benötigt sowie für die Einleitung der adaptiven Immunität (107, 108).

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der Expressionsstudien noch einmal vergleichend zusammengefasst. Dabei ist zu erkennen, wie hoch die Übereinstimmungen zwischen den immortalisierten und den primären Endothelzellen sind.

Bei den Ergebnissen, wo nur eine der beiden Zellarten eine Reaktion zeigte, muss in weiteren Versuchen geklärt werden, ob die Nicht-Reaktivität der jeweils anderen Zellart nur durch eine veränderte Rezeptorausstattung, und damit durch eine andere Rezeptordichte, oder durch veränderte Transport-/Signalmechanismen zustande kommt oder ob der entsprechende Rezeptor in den beobachteten Fällen tatsächlich nicht-reaktiv ist.

Der einzige echte Unterschied zwischen den beiden Endothelzellarten ist im TLR5-Signalweg zu finden, der durch das bakterielle Flagellin ausgelöst wird. Hier konnte bei ruhenden immortalisierten bzw. primären Endothelzellen eine gegensätzliche iNOS-Expression nach Behandlung beobachtet werden.

Readout	Zustand	TLR1	TLR2			TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10
TLR-Expression	ruhend	++	++			++	++	++	++	--	--	++	+ -
TLR-Expression	aktiviert	→↑	↑↑			↑↑	→→	→↓	↓→	↑↑	→↑	→→	→↑
	Liganden-zugabe	Pam ₃ Cys (TLR1/2)	LTA (TLR2/6)	PGN (TLR2, NOD1, NOD2)	Poly(I:C)	LPS	Flagellin		Imiquimod		CpG-DNA		
IL-8	ruhend	↑→	↑	→→	↑↑	↑↑	↑→		→→		→↓		
IL-8	aktiviert	↑→	→	→→	↑(↑)	↑(↑)	→→		↓→		→→		
iNOS	ruhend	→→	→	↓→	↑→	→↑	↓↑		→→		↓→		
iNOS	aktiviert	↑↑	→	↑↑	→→	→↑	→↑		→↑		→↑		

Tab. 11: Vergleichende Übersicht – HMEC-1 versus HDMEC – der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit. Aufgeführt ist die TLR-Expression in ruhenden Endothelzellen sowie die Expressionsmodulation der Rezeptoren unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine. Ferner sind die verwendeten Liganden und deren Einfluss auf die IL-8-Freisetzung und Aktivierung der iNOS-Expression sowohl in ruhenden als auch aktivierten Endothelzellen dargestellt. ↑: signifikante Steigerung, →: keine signifikante Veränderung, ↓: signifikante Reduktion der TLR-Expression/IL-8-Freisetzung/iNOS-Expression. (↑): Veränderungen nur bei den primären Endothelzellen zu beobachten, die mit zwei statt mit drei Zytokinen behandelt wurden. PGN, ehemals als Ligand für TLR2 angesehen, wurde mittlerweile als Ligand der Rezeptoren NOD1 sowie NOD2 identifiziert. Zwischen immortalisierten und primären Endothelzellen liegt eine hohe Übereinstimmung bei der TLR-Expression sowie der IL-8-Freisetzung bzw. der iNOS-Expression vor, gekennzeichnet durch gleichgerichtete Pfeile. Es ist in der ganzen Serie nur eine kontroverse Reaktion zu beobachten, die die iNOS-Expression in ruhenden Endothelzellen nach Stimulierung durch Flagellin betrifft (schwarzer Kreis). Bei allen übrigen Ergebnissen, bei der nur eine Endothelzellart keine Reaktion zeigt, muss weiter geklärt werden, inwiefern andere Umstände, wie z. B. die Rezeptordichte, eine wichtige Rolle spielen.

4.3.2 Peptidoglykan ist kein TLR2-, TLR1/2- oder TLR2/6-Ligand

In den vergangenen Jahren wurde PGN als Ligand für TLR2, TLR1/2 und TLR2/6 identifiziert (16, 18). Im Laufe der Zeit konnte eine Arbeitsgruppe zeigen, dass es sich bei der Immunantwort, ausgelöst durch PGN, nicht um eine TLR-vermittelte Reaktion handelt, sondern dass Kontaminationen mit LPS oder LTA zu den beobachteten Ergebnissen führten. PGN ist innerhalb der Zellwand kovalent an andere Polymere wie Lipoproteine oder LTA gebunden, daher gestaltete sich die Isolierung reinen PGNs als schwierig (109). In jüngerer Zeit wurde dann publiziert, dass Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomänen 1 und 2 (NOD1 und NOD2) molekulare Strukturen Gram-positiver sowie Gram-negativer Bakterien detektieren. NOD1 erkennt dabei vor allem hochspezifisch PGN-Strukturen Gram-negativer Bakterien. NOD2 hingegen detektiert allgemein das Muramyl-dipeptid-Motiv Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien. Beide Proteine führen zur Induktion des proinflammatorischen Signalweges via NF-κB

und TNF- α (19-21). Eine andere Arbeitsgruppe hat dann wiederum publiziert, dass starke synergistische Effekte zwischen der Pathogenerkennung von TLR2 und NOD1/NOD2 vorliegen und dass das Binden von PGN an NOD1/NOD2 zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch den TLR2-vermittelten Signalweg auslöst (110). Das heißt, dass die in dieser Arbeit gezeigten Daten für PGN nicht, wie ursprünglich gedacht, dem TLR2, sondern NOD1 und/oder NOD2 zuzuordnen sind.

4.3.3 Ausschluss von Kontaminations-Effekten

Da die Ergebnisse zu den Funktionsstudien nur dann aussagekräftig sein können, wenn eine der üblichen Kontaminationen und damit verbundene Nebeneffekte ausgeschlossen sind, wurden zusätzliche Experimente durchgeführt. Problematisch in diesem Zusammenhang sind vor allem Infektionen der Zellkulturen mit hautkommensalen Mykoplasmen-Bakterien sowie die Kontamination der Reagenzien mit ubiquitärem Endotoxin.

Kommt es durch unsachgemäße Handhabung zur Infektion der Zellkulturen mit Mykoplasmen, so werden die Zellen durch Lipid-assoziierten Membranproteine der Mykoplasmen aktiviert. Die Detektion dieser Strukturen erfolgt durch TLR2, vermutlich unter Beteiligung des TLR6, und führt zu ausgeprägten Entzündungsreaktionen, wie sie unter anderem durch IL-8-Freisetzung und iNOS-Expression charakterisiert sind (81, 85, 111-113). Zusätzlich droht immer eine Kontaminationsgefahr mit ubiquitärem Endotoxin. Die Problematik liegt hier zum einen in der Handhabung der normalen Zellkultur, zum anderen in der Herstellung/Isolierung oder in der anschließenden Verwendung der Liganden. Bereits geringe Kontaminationen mit Endotoxin (LPS) aktivieren den TLR4-Signalweg, und es kommt zur vollen Entwicklung einer Entzündungsreaktion, die sich ja anhand veränderter IL-8-Freisetzung und iNOS-Expression nachweisen läßt (114, 115), wie auch in dieser Arbeit gezeigt.

Um diese Problematiken auszuschließen, wurde die Zellkultur regelmäßig mittels einer speziellen Mykoplasmen-spezifischen PCR auf eine Infektion hin untersucht. Außerdem wurde eine eventuelle Kontamination der verwendeten TLR-Liganden mit Endotoxin durch Anwendung des Endotoxin-Inhibitors Polymyxin B überprüft. Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kontrollmaßnahmen können Artefakte in den Ergebnissen zur funktionellen TLR-Expression ausgeschlossen werden. Die beobachteten

Expressionsmodulationen sind somit tatsächlich auf die Wirkung der TLR-spezifischen Liganden zurückzuführen.

4.3.4 TLR-Expression in humaner Haut

Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen stellen eine Schlüsselfunktion in der Pathogenerkennung durch das natürliche Immunsystem dar. Die Haut als erste Verteidigungslinie des Wirtes verfügt, neben mechanischen und chemischen Abwehrmechanismen, auch über Abwehrmechanismen auf zellulärer Ebene, die das Vordringen der Erreger in das Gewebe und über die Blutgefäße auch in innere Organe verhindern. In diesem Zusammenhang haben verschiedene Arbeitsgruppen erfolgreich humane Keratinozyten, die Zellart, die den äußeren Schutzmantel der Haut bildet, bezüglich ihrer TLR-Expression charakterisiert (36, 38, 116, 117).

Vergleicht man nun die TLR-Expression der Hautendothelzellen mit der der Keratinozyten, so stellt man fest, dass sich die TLR-Expressionsmuster in einigen Teilen ähneln, jedoch auch gravierende Unterschiede aufweisen. In der Literatur werden verschiedene TLR-Expressionsmuster auf Keratinozyten diskutiert und bestehende Widersprüche konnten bislang noch nicht ausreichend aufgeklärt werden. Interessant ist, dass auf Keratinozyten keine funktionellen TLRs 7 und 8 nachgewiesen werden konnten. Nach Behandlung der primären Zellen mit den Liganden R-848 (TLR7 und TLR8) und Loxoribine (TLR7) konnte keine Immunantwort detektiert werden. Dies ist erstaunlich, da diese Liganden zur selben Strukturgruppe wie Imiquimod (TLR7) gehören, welches als Medikament zur Behandlung von Basaliomen angewendet wird und dort, als Creme auf die Haut aufgetragen, eine starke Entzündung hervorruft. TLR6 wird zumindest auf Genebene exprimiert, wurde aber bislang funktionell noch nicht untersucht. Die funktionelle Expression der TLRs 1, 2, 3, 5 und 9 hingegen ist belegt (36, 38, 116, 117).

Ein sehr interessanter Aspekt des TLR-Expressionsmusters auf Keratinozyten ist, dass diese Zellen, unabhängig vom Donor, vermutlich aufgrund fehlender Co-Faktoren (CD14, MD-2), keinen im herkömmlichen Sinn funktionellen TLR4 aufweisen. Die Entzündungsreaktion als Antwort auf den hochtoxischen TLR4-Liganden LPS unterbleibt in Keratinozyten, obwohl das Gen detektiert werden kann (36, 37). Dies scheint insofern sinnvoll, als das Keratinozyten im ständigen Kontakt mit Kommensalen stehen, die in

ihren Zellbestandteilen ebenfalls, wenn auch weniger toxische, LPS-Strukturen aufweisen. Das Erkennen von Bestandteilen der natürlichen und schützenden Bakterienflora der Haut, ohne dass eine Auslösung der herkömmlichen TLR-Signalkaskade erfolgt, rechtfertigt die "nicht-funktionelle" Expression des TLR4, ähnlich wie die Konditionierung intestinaler Zellen gegenüber Endotoxin (118-120). Eine geringe TLR4-Expression auf Genebene und eine ausbleibende Immunantwort auf die Behandlung mit LPS wurde auch bei dermalen Langerhans-Zellen beobachtet. Auch hier wird von den Autoren argumentiert, dass diese Form der TLR4-Expression/Nicht-Funktionalität zur Toleranz gegen die kommensale Bakterienflora der Haut beiträgt (121).

Bei Endothelzellen hingegen gehört die durch TLR4-vermittelte LPS-Antwort zu den stärksten Signalen im TLR-Signalweg. Die absolute Notwendigkeit der sehr sensitiven Erkennungsmethode des LPS durch den endothelialen TLR4 besteht, da mit jeder (Mikro-)Wunde Pathogene oder Kommensale in die Haut und damit auch in den Blutkreislauf eindringen können und dort, aufgrund ihrer schnellen Vermehrungsfähigkeit sowie ihres aggressiven Verhaltens und den guten Verbreitungswegen über die Blutbahnen, zu schwerwiegenden Schäden führen würden, wenn die Vermehrung und Verbreitung nicht kompetent und schnell eingeschränkt wird. Die Endothelzellen spielen hier ganz offensichtlich eine essentielle Rolle als natürliche Gewebe-/Blutgrenze und damit eine Funktion als "Gatekeeper".

Es gibt jedoch Hinweise auf eine besondere TLR4-"Funktion" bei Keratinozyten. So konnten Pivarcsi *et al.* (2004) zeigen, dass die TLR4-Expression in dem Maße steigt, indem Keratinozyten ausdifferenzieren. Die Autoren spekulieren daher, dass die TLR4-Expression Teil des Differenzierungsprozesses ist und dass über diesen Mechanismus die Keratinozyten zum Schutz der Haut gegenüber ubiquitären Bakterien beitragen (38).

4.4 Feedback-Mechanismus zwischen TLRs und iNOS

Nachdem in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen der funktionellen TLR-Expression und der Induktion der iNOS-Expression sowie der Freisetzung von NO- und Nitrosoverbindungen nicht nur durch LPS (66), sondern auch durch die anderen TLR-spezifischen Liganden Pam₃Cys, LTA, Poly(I:C), Flagellin, Imiquimod und CpG-DNA

erfolgreich hergestellt werden konnte, wurde weiter geklärt, ob das durch die iNOS freigesetzte NO einen Einfluss auf die TLR-Expression im Sinne eines Feedback-Mechanismus hat. Mit Hilfe des NOS-Inhibitors L-NIO, der die Funktion der iNOS in der verwendeten Konzentration durch kompetitive Hemmung inhibiert (122), wurde dieser Fragestellung nachgegangen, und es konnte tatsächlich ein Feedback-Mechanismus zwischen dem von der iNOS freigesetzten NO und der TLR-Expression verifiziert werden. Durch Aktivierung primärer Endothelzellen mit proinflammatorischen Zytokinen wird die Expression verschiedener Zytokin-sensitiver TLRs induziert bzw. gesteigert. Im gleichen Zug kommt es zur Induktion der iNOS-Expression und damit verbundener Freisetzung von NO. Durch Verwendung eines NOS-Inhibitors wurde die Enzymaktivität der iNOS, und damit auch die NO-Freisetzung, unterbunden. Die unterdrückte NO-Freisetzung führte wiederum zu einer Reduktion der TLR-Expression. Das bedeutet, dass die Expression der entsprechenden Rezeptoren durch das von der iNOS-freigesetzte NO gesteigert wird.

Durch diesen aufgezeigten Feedback-Mechanismus wird deutlich, dass die Pathogenerkennung durch TLRs nur die Initiation einer Entzündungsreaktion darstellt, dass zu dieser frühen Phase auch die Produktion und Freisetzung des Chemokins IL-8 gehört und dass in der späten Phase der Entzündungsreaktion ein Teil der TLR-Expression auch über das von der iNOS-freigesetzte NO gesteigert wird (Abb. 35).

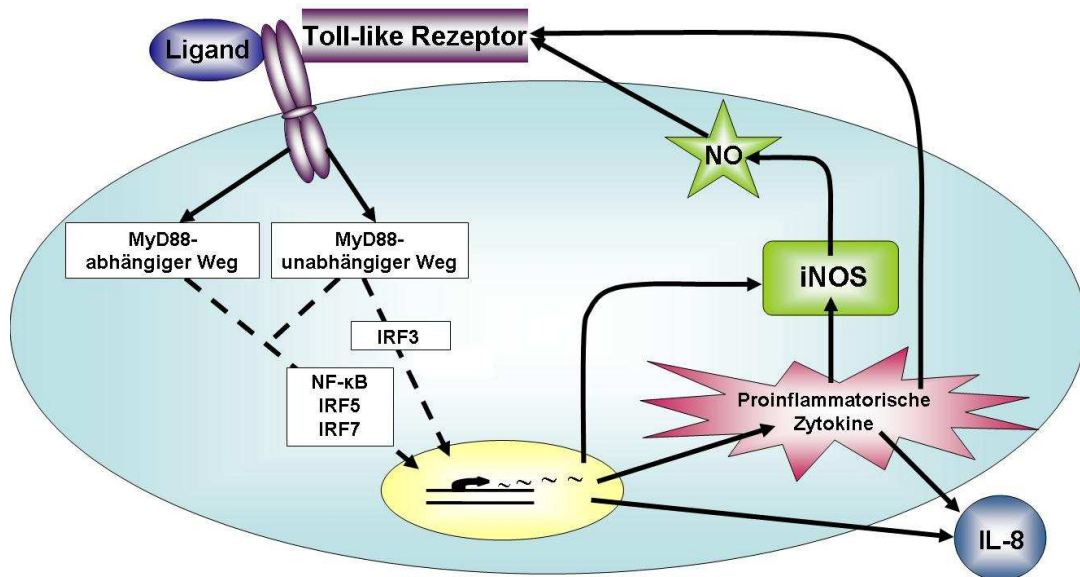


Abb. 35: Feedback-Mechanismus zwischen Toll-like Rezeptoren und NO der iNOS. Die Bindung des jeweiligen Liganden an seinen Rezeptor löst eine Signalkaskade aus, die über den MyD88-abhängigen oder -unabhängigen Weg zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB und/oder IRF α führt. Dadurch kommt es zur Aktivierung der iNOS, zur Produktion proinflammatorischer Zytokine sowie zur Freisetzung des für Endothelzellen charakteristischen Chemokins IL-8. Proinflammatorische Zytokine unterstützen in den meisten Fällen die Reaktion und verstärken sowohl die iNOS-Expression und die damit verbundene Bildung von NO als auch IL-8-Freisetzung. Diese Parameter wiederum wirken in einem Feedback-Mechanismus differenziell modulierend auf die TLR-Expression.

4.5 Einfluss von UVA- und UVB-Strahlung auf die TLR-Expression

Bislang wird die Ursache der UV-bedingten Immunsuppression auf DNA-Schäden durch kurzwellige UVA- sowie UVB-Strahlung zurückgeführt. Als akute Folge dieser phototoxischen DNA-Schäden wird die Hemmung der Antigenpräsentation auf dermalen Langerhanszellen und die daraus resultierende fehlende Zell-Zell-Kommunikation mit den T-Lymphozyten, die Freisetzung immunsupprimierender Zytokine sowie die Apoptose angesehen (79, 123, 124). Es wurden jedoch bis heute keine Untersuchungen bezüglich einer gestörten initialen Pathogenerkennung durch entsprechende Rezeptoren als Ursache der UV-bedingten Immunsuppression durchgeführt. Um den Effekt der UV-Bestrahlung auf die TLR-Expression in ruhenden als auch voraktivierten Endothelzellen im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen, wurden die Zellen sowohl mit niedrigen als

auch hohen UVA- oder UVB-Dosen bestrahlt und die Veränderungen in der TLR-Expression untersucht.

Werden nicht-voraktivierte HDMEC, also "gesunde" primäre Endothelzellen, mit UVA oder UVB bestrahlt, kann nur eine mäßige Expressionsveränderung einiger weniger TLRs beobachtet werden. Dabei führt eine geringe UVA-Dosis zu einer Expressionssteigerung des TLR4 sowie zu einer *de novo*-Synthese des TLR8 und eine hohe UVA-Dosis zu einer starken *de novo*-Expression des TLR7. Nach Behandlung ruhender Zellen mit geringen Mengen an UVB wird die mRNA-Expression des TLR1 hochreguliert. TLR9 zeigt eine Expressionssteigerung bei hoher UVB-Dosis. TLR5 zeigt, ähnlich wie bei den Zytokin-aktivierten Zellen, sowohl bei geringen als auch hohen UVB-Dosen eine Expressionsreduktion. Die TLRs 7, 8 und 10 werden nach UVB-Behandlung ebenfalls *de novo* exprimiert.

Werden Endothelzellen im Vorfeld mit dem proinflammatorischen Zytokintriplett IL-1 β , TNF- α und IFN- γ in einen simulierten Entzündungszustand gebracht, wie er zum Beispiel während der Wundheilung auftritt, und bestrahlt man diese Zellen mit UV-Licht, so kann eine deutlich erhöhte Strahlensensitivität bezüglich einer veränderten TLR-Expression beobachtet werden. Interessant ist hierbei, dass die Rezeptoren, die unter Zytokin-Behandlung keiner Expressionsregulation unterlegen waren, durch zusätzliche UV-Strahlung in ihrer Expression herunterreguliert werden (TLRs 4 und 6 sowohl bei UVA- als auch UVB-Behandlung, TLR9 nur bei UVA-Bestrahlung) und dass einige Rezeptoren, die durch Behandlung mit proinflammatorischen Zytokinen in ihrer Expression hochreguliert oder *de novo* exprimiert, durch zusätzliche UV-Bestrahlung wieder herunterreguliert werden (TLRs 1 und 7, TLR 10 (nur UVA), TLRs 2, 3 und 8 (nur UVB)). Einzig TLR9 zeigt bei einer Kombination aus Zytokin-Behandlung und UVB-Bestrahlung eine Expressionssteigerung. Außerdem reagiert TLR5, der Rezeptor, der bei der Behandlung mit proinflammatorischen Zytokinen mit einer Expressionsreduktion reagierte, unter UVA-Bestrahlung mit einer weiteren Expressionsreduktion. Dies bedeutet, dass die TLR-Expression auch durch andere sterile Entzündungsstimuli reguliert werden kann. Es könnte außerdem ein Hinweis darauf sein, warum sonnenexponierte Personen auf der einen Seite anfälliger für Infektionen sind (z. B. durch Herpes simplex, Candida, Listerien, Mykobakterien) (125), warum verschiedene Hauterkrankungen durch UV-Strahlung verschlimmert werden (z. B. subakuter kutaner Lupus erythematosus oder rheumatische Autoimmunerkrankungen) (126), auf der

anderen Seite aber Verbesserungen verschiedener entzündlicher Hauterkrankungen zu beobachten sind (z. B. Psoriasis) (79).

Interessanterweise korrelieren die UVB-Ergebnisse der Real-time PCR-Studien zur TLR-Expression mit den Ergebnissen der Immunocytochemie. Bei der Untersuchung der Expression der TLRs 4 und 7 bei Zytokin-aktivierten und zusätzlich UVB-bestrahlten HDMEC wird deutlich, dass sowohl die TLR4- als auch die TLR7-Expression auf mRNA-Ebene herunterreguliert wird (18-Stunden-Werte) und dass sich dieses Ergebnis auf Proteinebene für beide Rezeptoren widerspiegelt (24-Stunden-Werte). Es ist daher, und aufgrund der besprochenen Untersuchungen zur Funktionalität, anzunehmen, dass die auf Genebene beobachteten Expressionen der TLRs 1-10 auch auf die Proteinebene zutreffen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben weiter einen Hinweis darauf, dass eine einmalige UV-Dosis nicht zu einer TLR-induzierten Immunsuppression führt, sondern dass erst die UV-Bestrahlung in einer proinflammatorischen Situation die reduzierte TLR-Expression auslöst. Es ist also denkbar, dass eine Entzündungssituation, wie sie hier durch die Behandlung mit proinflammatorischen Zytokinen experimentell erzeugt wurde, der Situation einer wiederholten UV-Bestrahlung oder einer Wundheilung ähnlich ist. Das heißt vermutlich aber auch, dass eine einmalige, mäßige UV-Exposition keinen Einfluss auf den Immunstatus hat und dass es erst durch wiederholte Sonnenbäder zu immunologischen Veränderungen kommt.

4.6 Expression eines TLR7-Pseudogens

Im Verlauf der Arbeit stellte sich durch wiederholte Sequenzvergleiche heraus, dass ein TLR7-Pseudogen existiert, welches eine 99 %-ige Sequenzhomologie im offenen Leseraster zum TLR7-Gen aufweist. Lange Zeit wurde ein Pseudogen definiert als ein Gen, welches neben der kodierenden Sequenz auch regulatorische Bereiche sowie Introns aufweisen kann, jedoch nicht als funktionelles Protein kodiert (127). In den letzten Jahren hat sich jedoch immer mehr abgezeichnet, dass auch Pseudogene transkribiert werden können (128). Je ausgeprägter dabei die Homologie zum echten Gen und je höher der Grad der konservierten Sequenz ist, desto höher ist die

Wahrscheinlichkeit, dass das Pseudogen dann auch regulatorische Funktionen im Zellstoffwechsel einnimmt (129-131).

Basierend auf diesen Fakten sollte also geklärt werden, ob das TLR7-Pseudogen mittels RT/PCR detektiert und ob die transkribierte mRNA des Pseudogens durch proinflammatorische Stimuli (UV-Strahlung und/oder Zytokine) differentiell moduliert werden kann. Weiter sollte untersucht werden, ob die bei den mit proinflammatorischen Zytokinen behandelten oder UVB-bestrahlten HMEC-1 bzw. HDMEC beobachteten Expressionsmodulationen auf das echte TLR7-Gen oder (auch) auf das Pseudogen zurückzuführen sind.

Für den Nachweis mittels Real-time PCR wurden entsprechende Oligonukleotide synthetisiert, die zwischen den beiden Genen differenzieren, da sie die unterschiedlichen mRNA-Sequenzen der Gene vor dem "Start-ATG" mit einbeziehen. Es stellte sich heraus, dass bei primären Endothelzellen eine gewisse Modulation des Pseudogens zu beobachten ist, während die Expression bei immortalisierten Endothelzellen nicht nachgewiesen werden kann.

Die hohe Übereinstimmung der Gensequenzen (echtes TLR7-Gen *versus* TLR7-Pseudogen) sowie die Fähigkeit zur differentiellen Expressionsmodulation bei primären Endothelzellen deuten darauf hin, dass es sich bei dem TLR7-Pseudogen um ein Pseudogen mit regulierenden Funktionen in der Zellphysiologie handelt. Hier sollen weitere Untersuchungen noch klären, welche Rolle dieses Pseudogen spielen könnte.

5 Zusammenfassung

Toll-like Rezeptoren (TLRs) erkennen als Keimbahn-kodierte Rezeptoren des natürlichen Immunsystems evolutionär konservierte Strukturen (Pathogen-assoziierte molekulare Muster = PAMP) von Bakterien, Viren, Pilzen sowie Parasiten und lösen dann eine Entzündungsreaktion aus.

Das Ziel dieser Arbeit war, humane Hautendothelzellen bezüglich ihrer TLR-Expression zu charakterisieren und ihre funktionelle Beteiligung an der Pathogen-assoziierten Entzündungsreaktion zu untersuchen.

Auf ruhenden immortalisierten (HMEC-1) sowie primären mikrovaskulären Haut-Endothelzellen (HDMEC) konnten acht beziehungsweise sieben von den zehn beim Menschen bekannten TLRs auf Genebene detektiert werden. Unter sterilen entzündlichen Bedingungen, wie sie durch proinflammatorische Zytokine oder UV-Strahlung hervorgerufen werden, konnten dann jeweils alle zehn TLRs nachgewiesen werden. Interessanterweise werden sie je nach Rezeptor und je nach Aktivierungsreiz (Zytokine, UVA-Strahlung, UVB-Strahlung) entweder hoch- oder auch herunterreguliert oder konstitutiv exprimiert. Zusätzlich konnte ein durch Sequenzvergleiche identifiziertes TLR7-Pseudogen als Transkript ebenfalls in Endothelzellen nachgewiesen werden. Dabei unterliegt es auf mRNA-Ebene in primären, nicht jedoch in immortalisierten Zellen einer mäßigen differentiellen Modulation. Für die Rezeptoren TLR4 und TLR7 konnte gezeigt werden, dass die durch UVB-Strahlung hervorgerufene differentiell modulierte Genexpression mit den Proteinmengen korreliert.

Um die Funktionalität der Rezeptoren zu überprüfen, wurden die Endothelzellen mit verschiedenen TLR-spezifischen Liganden (Pam₃Cys, LTA, Poly(I:C), LPS, Flagellin, Imiquimod und CpG-DNA) behandelt und ihre Auswirkungen auf die pathogen-assoziierte Entzündungsreaktion durch Nachweis der IL-8-Sekretion sowie der iNOS-Expression bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle TLRs funktionell aktiv sind und dass die jeweilige Ligand/TLR-Bindung zu spezifischen Veränderungen der beiden untersuchten Entzündungsparameter führt. Es zeigte sich außerdem, dass die Liganden bei ruhenden und proinflammatorisch aktivierten Endothelzellen unterschiedlichen Einfluss auf den Verlauf der Entzündungsreaktion nehmen. Interessanterweise konnten dabei sowohl bei ruhenden als auch bei proinflammatorisch voraktivierten Endothelzellen nicht nur fehlende oder gesteigerte Antworten nachgewiesen werden, sondern durch die Liganden Flagellin, Imiquimod und CpG-DNA auch verminderte IL-8-Spiegel

beziehungsweise reduzierte iNOS-Expressionen beobachtet werden. Mittels Chemilumineszenzdetektion konnten in Endothelzellen sowohl durch Inkubation mit dem exemplarisch ausgewählten Liganden Poly(I:C) als auch mit proinflammatorischen Zytokinen gesteigerte Mengen an Nitrosoverbindungen als Maß für die zelluläre NO-Synthese nachgewiesen werden. Dabei führt der TLR-Ligand zu einer stärkeren und früheren Antwort relativ zu der NO-Synthese nach Zugabe der proinflammatorischen Zytokine.

Durch Verwendung des NOS-Inhibitors L-NIO konnte in dieser Arbeit auch eine Wirkung des von der iNOS freigesetzten NO auf die TLR-Expression nachgewiesen werden. Für proinflammatorische Zytokine sensitive TLRs werden dabei durch Inhibition der iNOS, im Sinne eines Feedback-Mechanismus, herunterreguliert. Das bedeutet im Gegenzug, dass ein Teil der gesteigerten TLR-Expression auf das von der iNOS-freigesetzte NO zurückzuführen ist.

6 Abstract

Toll-like receptors (TLRs) are germline-encoded receptors of the innate immune system that recognize evolutionally conserved structures (pathogen-associated molecular patterns = PAMP) of bacteria, viruses, fungi as well as parasites and initiate inflammatory reactions.

The aim of this work was to characterise the TLR expression on human endothelial cells and to examine their functional participation in pathogen-associated inflammatory reactions.

On resting immortalised (HMEC-1) as well as on primary microvascular endothelial cells (HDMEC) eight respectively seven out of ten known human TLRs could be detected at the gene level. In sterile inflammatory conditions, as they were simulated by proinflammatory cytokines or UV-irradiation, all ten TLRs were expressed. Interestingly, the receptors are either up or downregulated or constitutively expressed depending on the respective receptor and depending on the activation stimulus (cytokines, UVA-irradiation, UVB-irradiation).

Additionally, during the search for sequence analogies a transcript of a TLR7-pseudogene was detected. On the mRNA-level it is moderately modulated in a differential mode in primary cells, but not in immortalised cells. The differentially modulated gene expression of the receptors TLR4 and TLR7 and their amount of protein correlates in UVB-irradiated cells.

To prove receptor function, endothelial cells were challenged with different TLR-specific ligands (Pam₃Cys, LTA, poly(I:C), LPS, flagellin, Imiquimod and CpG-DNA) and their impact on the pathogen-associated inflammatory reaction was evaluated by measuring the secretion of IL-8 and expression of iNOS. It could be demonstrated that all TLRs are functionally active and that each ligand/TLR-binding leads to specific variations of both inflammatory markers. Interestingly, the different ligands exert differential effects on the inflammatory process in resting or activated endothelial cells. Moreover, on resting as well as on activated endothelial cells, no responses or increased responses but also reduced responses could be detected. Suppression was seen with the ligands flagellin, Imiquimod and CpG-DNA. Using chemiluminescence detection increased amounts of nitrosated proteins as indicator for enhanced NO-synthesis could be detected following addition of either the example-ligand poly(I:C) or of proinflammatory cytokines. Thus,

this TLR-ligand leads to a stronger and earlier response, as compared to the response following proinflammatory cytokines.

By using the NOS-inhibitor L-NIO, the impact of iNOS-mediated NO release on TLR-expression could also be demonstrated. TLRs that are sensitive for proinflammatory cytokines were downregulated by inhibition of iNOS by means of a feedback-loop. This in turn demonstrates, that some of the increased TLR-expression is based on the NO released by iNOS.

7 Literaturverzeichnis

1. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783.
2. McInturff, J. E., R. L. Modlin, and J. Kim. 2005. The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol* 125:1.
3. Kaisho, T., and S. Akira. 2006. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 117:979.
4. Takeda, K., and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17:1.
5. Akira, S. 2000. Toll-like receptors: lessons from knockout mice. *Biochem Soc Trans* 28:551.
6. Moussian, B., and S. Roth. 2005. Dorsventral axis formation in the Drosophila embryo--shaping and transducing a morphogen gradient. *Curr Biol* 15:R887.
7. Royet, J., J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. 2005. Sensing and signaling during infection in Drosophila. *Curr Opin Immunol* 17:11.
8. Beutler, B. 2004. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430:257.
9. Poltorak, A., I. Smirnova, X. He, M. Y. Liu, C. Van Huffel, O. McNally, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, X. Du, P. Thompson, E. K. Chan, J. Ledesma, B. Roe, S. Clifton, S. N. Vogel, and B. Beutler. 1998. Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* 24:340.
10. Netea, M. G., G. Ferwerda, C. A. van der Graaf, J. W. Van der Meer, and B. J. Kullberg. 2006. Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. *Curr Pharm Des* 12:4195.
11. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085.
12. Koedel, U., B. Angele, T. Rupprecht, H. Wagner, A. Roggenkamp, H.-W. Pfister, and C. J. Kirschning. 2003. Toll-Like Receptor 2 Participates in Mediation of Immune Response in Experimental Pneumococcal Meningitis. *J Immunol* 170:438.
13. Wang, J., Y. Shao, T. A. Bennett, R. A. Shankar, P. D. Wightman, and L. G. Reddy. 2006. The Functional Effects of Physical Interactions among Toll-like Receptors 7, 8, and 9. *J. Biol. Chem.* 281:37427.
14. Kang, S. S., L. S. Kauls, and A. A. Gaspari. 2006. Toll-like receptors: applications to dermatologic disease. *J Am Acad Dermatol* 54:951.
15. Aliprantis, A. O., R. B. Yang, M. R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J. D. Radolf, G. R. Klimpel, P. Godowski, and A. Zychlinsky. 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285:736.
16. Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe, and C. J. Kirschning. 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274:17406.
17. Schroder, N. W., S. Morath, C. Alexander, L. Hamann, T. Hartung, U. Zahringer, U. B. Gobel, J. R. Weber, and R. R. Schumann. 2003. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via

- Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 278:15587.
18. Yoshimura, A., E. Lien, R. R. Ingalls, E. Tuomanen, R. Dziarski, and D. Golenbock. 1999. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 163:1.
 19. Strober, W., P. J. Murray, A. Kitani, and T. Watanabe. 2006. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 6:9.
 20. Kufer, T. A., D. J. Banks, and D. J. Philpott. 2006. Innate immune sensing of microbes by Nod proteins. *Ann N Y Acad Sci* 1072:19.
 21. Girardin, S. E., M. Jehanno, D. Mengin-Lecreulx, P. J. Sansonetti, P. M. Alzari, and D. J. Philpott. 2005. Identification of the critical residues involved in peptidoglycan detection by Nod1. *J Biol Chem* 280:38648.
 22. Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-[kappa]B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732.
 23. Fujihara, M., M. Muroi, K. Tanamoto, T. Suzuki, H. Azuma, and H. Ikeda. 2003. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther* 100:171.
 24. Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099.
 25. Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3:196.
 26. Shirota, H., M. Gursel, and D. M. Klinman. 2004. Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit Th1 differentiation by blocking IFN-gamma- and IL-12-mediated signaling. *J Immunol* 173:5002.
 27. Bartz, H., Y. Mendoza, M. Gebker, T. Fischborn, K. Heeg, and A. Dalpke. 2004. Poly-guanosine strings improve cellular uptake and stimulatory activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in human leukocytes. *Vaccine* 23:148.
 28. Krieg, A. M. 2006. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 5:471.
 29. Kawai, T., and S. Akira. 2005. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 17:338.
 30. Kawai, T., and S. Akira. 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ* 13:816.
 31. Bhor, V. M., C. J. Thomas, N. Surolia, and A. Surolia. 2005. Polymyxin B: an ode to an old antidote for endotoxic shock. *Mol Biosyst* 1:213.
 32. Wiese, A., T. Gutsmann, and U. Seydel. 2003. Towards antibacterial strategies: studies on the mechanisms of interaction between antibacterial peptides and model membranes. *J Endotoxin Res* 9:67.
 33. Sukkar, M. B., S. Xie, N. M. Khorasani, O. M. Kon, R. Stanbridge, R. Issa, and K. F. Chung. 2006. Toll-like receptor 2, 3, and 4 expression and function in human airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* 118:641.
 34. Cassiani-Ingoni, R., E. S. Cabral, J. D. Lunemann, Z. Garza, T. Magnus, H. Gelderblom, P. J. Munson, A. Marques, and R. Martin. 2006. *Borrelia burgdorferi*

- Induces TLR1 and TLR2 in human microglia and peripheral blood monocytes but differentially regulates HLA-class II expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:540.
35. Yokoyama, T., A. Komori, M. Nakamura, Y. Takii, T. Kamihira, S. Shimoda, T. Mori, S. Fujiwara, M. Koyabu, K. Taniguchi, H. Fujioka, K. Migita, H. Yatsuhashi, and H. Ishibashi. 2006. Human intrahepatic biliary epithelial cells function in innate immunity by producing IL-6 and IL-8 via the TLR4-NF-kappaB and -MAPK signaling pathways. *Liver Int* 26:467.
 36. Kollisch, G., B. N. Kalali, V. Voelcker, R. Wallich, H. Behrendt, J. Ring, S. Bauer, T. Jakob, M. Mempel, and M. Ollert. 2005. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology* 114:531.
 37. Kawai, K., H. Shimura, M. Minagawa, A. Ito, K. Tomiyama, and M. Ito. 2002. Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 30:185.
 38. Pivarcsi, A., A. Koreck, L. Bodai, M. Szell, C. Szeg, N. Belso, A. Kenderessy-Szabo, Z. Bata-Csorgo, A. Dobozy, and L. Kemeny. 2004. Differentiation-regulated expression of Toll-like receptors 2 and 4 in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 296:120.
 39. Faure, E., O. Equils, P. A. Sieling, L. Thomas, F. X. Zhang, C. J. Kirschning, N. Polentarutti, M. Muzio, and M. Arditi. 2000. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* 275:11058.
 40. Li, J., Z. Ma, Z. L. Tang, T. Stevens, B. Pitt, and S. Li. 2004. CpG DNA-mediated immune response in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L552.
 41. Morris, G. E., L. C. Parker, J. R. Ward, E. C. Jones, M. K. Whyte, C. E. Brightling, P. Bradding, S. K. Dower, and I. Sabroe. 2006. Cooperative molecular and cellular networks regulate Toll-like receptor-dependent inflammatory responses. *Faseb J* 20:2153.
 42. Hack, C. E., M. Hart, R. J. van Schijndel, A. J. Eerenberg, J. H. Nuijens, L. G. Thijs, and L. A. Aarden. 1992. Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators. *Infect Immun* 60:2835.
 43. Roebuck, K. A. 1999. Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB (Review). *Int J Mol Med* 4:223.
 44. Hoffmann, E., O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann, and M. Kracht. 2002. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 72:847.
 45. Kroncke, K. D., K. Fehsel, and V. Kolb-Bachofen. 1995. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376:327.
 46. Kroncke, K. D., K. Fehsel, and V. Kolb-Bachofen. 1998. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 113:147.
 47. Kroncke, K. D., C. V. Suschek, and V. Kolb-Bachofen. 2000. Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity. *Antioxid Redox Signal* 2:585.
 48. Kuhn, A., K. Fehsel, P. Lehmann, J. Krutmann, T. Ruzicka, and V. Kolb-Bachofen. 1998. Aberrant timing in epidermal expression of inducible nitric oxide synthase

- after UV irradiation in cutaneous lupus erythematosus. *J Invest Dermatol* 111:149.
49. Kadl, A., and N. Leitinger. 2005. The role of endothelial cells in the resolution of acute inflammation. *Antioxid Redox Signal* 7:1744.
 50. Cohen, J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420:885.
 51. Ades, E. W., F. J. Candal, R. A. Swerlick, V. G. George, S. Summers, D. C. Bosse, and T. J. Lawley. 1992. HMEC-1: Establishment of an Immortalized Human Microvascular Endothelial Cell Line. *J Invest Dermatol* 99:683.
 52. Hoge, M., and S. Amar. 2006. Role of interleukin-1 in bacterial atherogenesis. *Drugs Today (Barc)* 42:683.
 53. Lee, S. J., J. Y. Park, J. Hou, and E. N. Benveniste. 1999. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by proinflammatory cytokines in human astrocytes. *Glia* 25:21.
 54. El-Benna, J., P. M. Dang, M. A. Gougerot-Pocidal, and C. Elbim. 2005. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53:199.
 55. Nathan, C., and M. U. Shiloh. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8841.
 56. Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J* 6:3051.
 57. Somers, M. J., and D. G. Harrison. 1999. Reactive oxygen species and the control of vasomotor tone. *Curr Hypertens Rep* 1:102.
 58. Kirkeboen, K. A., and O. A. Strand. 1999. The role of nitric oxide in sepsis--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 43:275.
 59. Kirkeboen, K. A., and O. A. Strand. 1999. [Nitric oxide--an important mediator in sepsis?]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 119:4061.
 60. DeForge, L. E., J. C. Fantone, J. S. Kenney, and D. G. Remick. 1992. Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin 8 production in human whole blood. *J Clin Invest* 90:2123.
 61. Marty, C., B. Misset, F. Tamion, C. Fitting, J. Carlet, and J. M. Cavaillon. 1994. Circulating interleukin-8 concentrations in patients with multiple organ failure of septic and nonseptic origin. *Crit Care Med* 22:673.
 62. Van Zee, K. J., L. E. DeForge, E. Fischer, M. A. Marano, J. S. Kenney, D. G. Remick, S. F. Lowry, and L. L. Moldawer. 1991. IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration. *J Immunol* 146:3478.
 63. Brasier, A. R., M. Jamaluddin, A. Casola, W. Duan, Q. Shen, and R. P. Garofalo. 1998. A promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of Rel A, NF-kappaB1, and c-Rel transcription factors. *J Biol Chem* 273:3551.
 64. Mukaida, N., Y. Mahe, and K. Matsushima. 1990. Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 265:21128.
 65. Bruch-Gerharz, D., T. Ruzicka, and V. Kolb-Bachofen. 2003. Stickstoffmonoxid in der Pathogenese entzündlicher Dermatosen. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 1:894.

66. Frantz, S., L. Kobzik, Y. D. Kim, R. Fukazawa, R. Medzhitov, R. T. Lee, and R. A. Kelly. 1999. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest* 104:271.
67. Suschek, C. V., C. Mahotka, O. Schnorr, and V. Kolb-Bachofen. 2004. UVB radiation-mediated expression of inducible nitric oxide synthase activity and the augmenting role of co-induced TNF-alpha in human skin endothelial cells. *J Invest Dermatol* 123:950.
68. Cotton, S. A., A. L. Herrick, M. I. Jayson, and A. J. Freemont. 1999. Endothelial expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in systemic sclerosis skin. *J Pathol* 189:273.
69. Alderton, W. K., C. E. Cooper, and R. G. Knowles. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593.
70. Suschek, C. V., O. Schnorr, and V. Kolb-Bachofen. 2004. The role of iNOS in chronic inflammatory processes in vivo: is it damage-promoting, protective, or active at all? *Curr Mol Med* 4:763.
71. Kroncke, K. D., K. Fehsel, C. Suschek, and V. Kolb-Bachofen. 2001. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int Immunopharmacol* 1:1407.
72. Ehrt, S., D. Schnappinger, S. Bekiranov, J. Drenkow, S. Shi, T. R. Gingeras, T. Gaasterland, G. Schoolnik, and C. Nathan. 2001. Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J Exp Med* 194:1123.
73. Ishii, Y., T. Ogura, M. Tatemichi, H. Fujisawa, F. Otsuka, and H. Esumi. 2003. Induction of matrix metalloproteinase gene transcription by nitric oxide and mechanisms of MMP-1 gene induction in human melanoma cell lines. *Int J Cancer* 103:161.
74. Vinas, J. L., A. Sola, M. Genesca, V. Alfaro, F. Pi, and G. Hotter. 2006. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 40:992.
75. Ijuin, R., N. Umezawa, S. Nagai, and T. Higuchi. 2005. Evaluation of 3-substituted arginine analogs as selective inhibitors of human nitric oxide synthase isozymes. *Bioorg Med Chem Lett* 15:2881.
76. Li, H., and U. Forstermann. 2000. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 190:244.
77. Feelisch, M., T. Rassaf, S. Mnaimneh, N. Singh, N. S. Bryan, D. Jourdain, and M. Kelm. 2002. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *Faseb J* 16:1775.
78. Pelletier, M. M., P. Kleinbongard, L. Ringwood, R. Hito, C. J. Hunter, A. N. Schechter, M. T. Gladwin, and A. Dejam. 2006. The measurement of blood and plasma nitrite by chemiluminescence: pitfalls and solutions. *Free Radic Biol Med* 41:541.
79. Matsumura, Y., and H. N. Ananthaswamy. 2002. Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2002:1.
80. Schwarz, T. 2005. Mechanisms of UV-induced immunosuppression. *Keio J Med* 54:165.

81. You, X. X., Y. H. Zeng, and Y. M. Wu. 2006. Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. *J Zhejiang Univ Sci B* 7:342.
82. Hasebe, A., N. D. Pennock, H. H. Mu, F. V. Chan, M. L. Taylor, and B. C. Cole. 2006. A microbial TLR2 agonist imparts macrophage-activating ability to apolipoprotein A-1. *J Immunol* 177:4826.
83. Kataoka, H., M. Yasuda, M. Iyori, K. Kiura, M. Narita, T. Nakata, and K.-i. Shibata. 2006. Roles of N-linked glycans in the recognition of microbial lipopeptides and lipoproteins by TLR2. *Cellular Microbiology* 8:1199.
84. Zeng, Y. H., Y. M. Wu, W. B. Zhang, M. J. Yu, C. M. Zhu, and L. Z. Tan. 2004. Activation of nuclear factor kappaB and induction of inducible nitric oxide synthase by lipid-associated membrane proteins isolated from Mycoplasma penetrans. *Chin Med J (Engl)* 117:997.
85. Kagemann, G., B. Henrich, M. Kuhn, H. Kleinert, and O. Schnorr. 2005. Impact of Mycoplasma hyorhinis infection on L-arginine metabolism: differential regulation of the human and murine iNOS gene. *Biol Chem* 386:1055.
86. Honda, K., H. Yanai, T. Mizutani, H. Negishi, N. Shimada, N. Suzuki, Y. Ohba, A. Takaoka, W. C. Yeh, and T. Taniguchi. 2004. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15416.
87. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265.
88. Iacobas, D. A., S. Iacobas, W. E. Li, G. Zoidl, R. Dermietzel, and D. C. Spray. 2005. Genes controlling multiple functional pathways are transcriptionally regulated in connexin43 null mouse heart. *Physiol Genomics* 20:211.
89. Zarembek, K. A., and P. J. Godowski. 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168:554.
90. Bourke, E., D. Bosisio, J. Golay, N. Polentarutti, and A. Mantovani. 2003. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* 102:956.
91. Sticherling, M., F. Hetzel, J.-M. Schroder, and E. Christophers. 1993. Time- and Stimulus-Dependent Secretion of NAP-1/IL-8 by Human Fibroblasts and Endothelial Cells. *J Invest Dermatol* 101:573.
92. Zhao, B., R. A. Bowden, S. A. Stavchansky, and P. D. Bowman. 2001. Human endothelial cell response to gram-negative lipopolysaccharide assessed with cDNA microarrays. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C1587.
93. Supp, D. M., K. Wilson-Landy, and S. T. Boyce. 2002. Human dermal microvascular endothelial cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice. *FASEB J.* 16:797.
94. Akira, S. 2003. Toll-like Receptor Signaling. *J. Biol. Chem.* 278:38105.
95. LeBouder, E., J. E. Rey-Nores, N. K. Rushmere, M. Grigorov, S. D. Lawn, M. Affolter, G. E. Griffin, P. Ferrara, E. J. Schiffrin, B. P. Morgan, and M. O. Labeta. 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.
96. Bruch-Gerharz, D., K. Fehsel, C. Suschek, G. Michel, T. Ruzicka, and V. Kolb-Bachofen. 1996. A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes. *J. Exp. Med.* 184:2007.

97. Hemmrich, K., C. V. Suschek, G. Lerzynski, and V. Kolb-Bachofen. 2003. iNOS activity is essential for endothelial stress gene expression protecting against oxidative damage. *J Appl Physiol* 95:1937.
98. Kofler, S., T. Nickel, and M. Weis. 2005. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clin Sci (Lond)* 108:205.
99. Mukaida, N. 2003. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L566.
100. Hayashi, F., T. K. Means, and A. D. Luster. 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102:2660.
101. Jozsef, L., T. Khreiss, D. El Kebir, and J. G. Filep. 2006. Activation of TLR-9 Induces IL-8 Secretion through Peroxynitrite Signaling in Human Neutrophils. *J Immunol* 176:1195.
102. Kim, J. M., N. I. Kim, Y.-K. Oh, Y.-J. Kim, J. Youn, and M.-J. Ahn. 2005. CpG oligodeoxynucleotides induce IL-8 expression in CD34+ cells via mitogen-activated protein kinase-dependent and NF- κ B-independent pathways. *Int. Immunol.* 17:1525.
103. Whitmore, M. M., M. J. DeVeer, A. Edling, R. K. Oates, B. Simons, D. Lindner, and B. R. G. Williams. 2004. Synergistic Activation of Innate Immunity by Double-Stranded RNA and CpG DNA Promotes Enhanced Antitumor Activity. *Cancer Res* 64:5850.
104. Sivori, S., M. Falco, M. D. Chiesa, S. Carlomagno, M. Vitale, L. Moretta, and A. Moretta. 2004. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: Induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *PNAS* 101:10116.
105. Bauer, M., V. Redecke, J. W. Ellwart, B. Scherer, J.-P. Kremer, H. Wagner, and G. B. Lipford. 2001. Bacterial CpG-DNA Triggers Activation and Maturation of Human CD11c-, CD123+ Dendritic Cells. *J Immunol* 166:5000.
106. Wingender, G., N. Garbi, B. Schumak, F. Jungerkes, E. Endl, D. von Bubnoff, J. Steitz, J. Striegler, G. Moldenhauer, T. Tuting, A. Heit, K. M. Huster, O. Takikawa, S. Akira, D. H. Busch, H. Wagner, G. J. Hammerling, P. A. Knolle, and A. Limmer. 2006. Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO. *Eur J Immunol* 36:12.
107. Young, H. A., and J. Ortaldo. 2006. Cytokines as critical co-stimulatory molecules in modulating the immune response of natural killer cells. *Cell Res* 16:20.
108. Ozato, K., H. Tsujimura, and T. Tamura. 2002. Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system. *Biotechniques Suppl*:66.
109. Travassos, L. H., S. E. Girardin, D. J. Philpott, D. Blanot, M. A. Nahori, C. Werts, and I. G. Boneca. 2004. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep* 5:1000.
110. Netea, M. G., G. Ferwerda, D. J. de Jong, T. Jansen, L. Jacobs, M. Kramer, T. H. J. Naber, J. P. H. Drenth, S. E. Girardin, B. Jan Kullberg, G. J. Adema, and J. W. M. Van der Meer. 2005. Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-2 Modulates Specific TLR Pathways for the Induction of Cytokine Release *J Immunol* 174:6518.
111. Chu, H. W., S. Jeyaseelan, J. G. Rino, D. R. Voelker, R. B. Wexler, K. Campbell, R. J. Harbeck, and R. J. Martin. 2005. TLR2 Signaling Is Critical for Mycoplasma pneumoniae-Induced Airway Mucin Expression. *J Immunol* 174:5713.

112. Chmura, K., R. D. Lutz, H. Chiba, M. S. Numata, H.-J. Choi, G. Fantuzzi, D. R. Voelker, and E. D. Chan. 2003. Mycoplasma pneumoniae Antigens Stimulate Interleukin-8. *Chest* 123:425S.
113. Krutzik, S. R., and R. L. Modlin. 2004. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Semin Immunol* 16:35.
114. Trent, M. S., C. M. Stead, A. X. Tran, and J. V. Hankins. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. *Journal of Endotoxin Research* 12:205.
115. Dauphinee, S. M., and A. Karsan. 2005. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* 86:9.
116. Baker, B. S., J. M. Ovigne, A. V. Powles, S. Corcoran, and L. Fry. 2003. Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 148:670.
117. Mempel, M., V. Voelcker, G. Kollisch, C. Plank, R. Rad, M. Gerhard, C. Schnopp, P. Fraunberger, A. K. Walli, J. Ring, D. Abeck, and M. Ollert. 2003. Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor kappaB controlled gene activation by Staphylococcus aureus is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. *J Invest Dermatol* 121:1389.
118. Tlaskalova-Hogenova, H., R. Stepankova, T. Hudcovic, L. Tuckova, B. Cukrowska, R. Lodinova-Zadnikova, H. Kozakova, P. Rossmann, J. Bartova, D. Sokol, D. P. Funda, D. Borovska, Z. Rehakova, J. Sinkora, J. Hofman, P. Drastich, and A. Kokesova. 2004. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett* 93:97.
119. Medvedev, A. E., I. Sabroe, J. D. Hasday, and S. N. Vogel. 2006. Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease. *J Endotoxin Res* 12:133.
120. Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, and R. Medzhitov. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118:229.
121. Mitsui, H., T. Watanabe, H. Saeki, K. Mori, H. Fujita, Y. Tada, A. Asahina, K. Nakamura, and K. Tamaki. 2004. Differential Expression and Function of Toll-like Receptors in Langerhans Cells: Comparison with Splenic Dendritic Cells. *J Invest Dermatol* 122:95.
122. Mulligan, M. S., S. Moncada, and P. A. Ward. 1992. Protective effects of inhibitors of nitric oxide synthase in immune complex-induced vasculitis. *Br J Pharmacol* 107:1159.
123. Young, A. R. 2006. Acute effects of UVR on human eyes and skin. *Prog Biophys Mol Biol* 92:80.
124. Brink, N., M. Szamel, A. R. Young, K. P. Wittern, and J. Bergemann. 2000. Comparative quantification of IL-1 β , IL-10, IL-10r, TNFa and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo. *Inflammation Research* 49:290.
125. Chapman, R. S., K. D. Cooper, E. C. De Fabo, J. E. Frederick, K. N. Gelatt, S. P. Hammond, P. Hersey, H. S. Koren, R. D. Ley, F. Noonan, and et al. 1995. Solar ultraviolet radiation and the risk of infectious disease: summary of a workshop. *Photochem Photobiol* 61:223.
126. Drosera, M., F. Facchetti, S. Landolfo, M. Mondini, F. Nyberg, A. Parodi, A. Santoro, S. Zampieri, and A. Doria. 2006. Role of soluble and cell surface molecules in the pathogenesis of autoimmune skin diseases. *Clin Exp Rheumatol* 24:57.

127. Karro, J. E., Y. Yan, D. Zheng, Z. Zhang, N. Carriero, P. Cayting, P. Harrison, and M. Gerstein. 2006. Pseudogene.org: a comprehensive database and comparison platform for pseudogene annotation. *Nucl. Acids Res.:*gkl851.
128. Balakirev, E. S., and F. J. Ayala. 2003. Pseudogenes: Are They "Junk" or Functional DNA? *Annual Review of Genetics* 37:123.
129. McCarrey, J. R., and A. D. Riggs. 1986. Determinator--Inhibitor Pairs as a Mechanism for Threshold Setting in Development: A Possible Function for Pseudogenes. *PNAS* 83:679.
130. Korneev, S. A., J.-H. Park, and M. O'Shea. 1999. Neuronal Expression of Neural Nitric Oxide Synthase (nNOS) Protein Is Suppressed by an Antisense RNA Transcribed from an NOS Pseudogene. *J. Neurosci.* 19:7711.
131. Hirotsune, S., N. Yoshida, A. Chen, L. Garrett, F. Sugiyama, S. Takahashi, K.-i. Yagami, A. Wynshaw-Boris, and A. Yoshiki. 2003. An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. *Nature* 423:91.

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Nicole Fitzner
Geburtsdatum: 13.10.1976
Geburtsort: Düsseldorf
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1983 - 1987 St. Martinus Grundschule (Neuss)
1987 - 1996 Erzbischöfliches Gymnasium Marienberg (Neuss)

Hochschulbildung

10/1996 – 02/2002 Studium der Oecotrophologie an der
Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Abschluss: Dipl.-Oecotrophologin
09/2001 – 02/2002 Diplom-Arbeit am Institut für Physiologische
Chemie der Medizinischen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
*„Funktionelle Charakterisierung der alpha- und
beta-Untereinheit im dimeren Glucosidas II-
Komplex aus menschlicher Leber“*

Universitäre Tätigkeiten

10/1998 – 12/1998	Erstsemestertutorien, Universität Bonn Institut für Landtechnik
10/1999 – 12/1999	Institut für Ernährungswissenschaft
11/2000 – 12/2000	Institut für Ernährungswissenschaft
06/2001 – 02/2002	Studentische Hilfskraft am Institut für Physiologische Chemie, Universität Bonn
03/2002 - 03/2003	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Physiologische Chemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
06/2003 -	Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Forschungsgruppe Immunbiologie am Institut für Molekulare Medizin an der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 20.12.2006