

Aus dem Institut für Molekulare Medizin, Forschungsgruppe Immunbiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leiterin: Prof. Dr. Victoria Kolb-Bachofen

**Das TLR-Adapterprotein MyD88 in humanen
Endothelzellen:
Subzelluläre Lokalisation des endogenen Proteins
vor und nach Inkubation mit spezifischen
Toll-like Rezeptor-Liganden**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Sigrid Clauberg
(2011)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referentin: Prof. Dr. Kolb-Bachofen

Korreferent: Prof. Dr. Däubener

Danksagung

Für die gute kontinuierliche Betreuung der Arbeit bedanke ich mich bei Fr. Prof. V. Kolb-Bachofen.

Herrn Prof. W. Däubener danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Dr. F. Essmann gilt mein Dank für die Hilfe bei der konfokalen Mikroskopie.

Bei meiner Familie und besonders bei Ralf Clauberg möchte ich mich für die Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit bedanken.

Allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe Immunbiologie danke ich für die zahlreichen Hilfestellungen und die gute Arbeitsatmosphäre.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Toll-like Rezeptoren (TLRs)	1
1.2	Akzessorische Proteine und Adapter	4
1.3	Subzelluläre Lokalisationen.....	6
1.4	MyD88 (myeloid differentiation factor 88)	9
1.5	MyD88-abhängige Signalkaskade	9
1.6	Klinische Bedeutung.....	12
1.7	Endothelzellen	13
1.8	Interleukin-8	14
1.9	Zielsetzung.....	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Material.....	17
2.1.1	Geräte.....	17
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3	Chemikalien	18
2.1.4	Puffer und Lösungen.....	19
2.1.5	Zellkultur.....	20
2.1.5.1	Zellen.....	20
2.1.5.2	Materialien für die Zellkultur	20
2.1.6	Zellaktive Substanzen	21
2.1.7	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	22
2.1.8	Kits.....	23
2.2	Methoden	23
2.2.1	Zellkultur.....	23
2.2.1.1	Kulturbedingungen	23
2.2.1.2	Kultivierung.....	25
2.2.1.3	Einfrieren von Zellen.....	25

2.2.1.4	Auftauen eingefrorener Zellen.....	25
2.2.1.5	Aussaat für Versuche.....	25
2.2.1.6	Aktivierung durch Zytokine und spezifische TLR-Liganden.....	26
2.2.2	Immunzytochemie (ICC)	27
2.2.3	Immunfluoreszenz (IF)	29
2.2.4	Bestimmung der IL-8 Konzentration der Zellkulturüberstände mittels ELISA	29
2.2.5	Protein-Assay	31
2.3	Statistische Auswertung.....	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Immunzytochemische Untersuchung der Zelllinie EA.hy 926.....	32
3.2	Modulation der IL-8 Sekretion durch TLR-spezifische und unspezifische Aktivierung bei verschiedenen Endothelien	34
3.3	Translokation von MyD88 durch spezifische TLR-Stimulierung	39
3.4	Untersuchung des Färbungsmusters des Antikörpers MyD88 _(internes Peptid)	46
4	Diskussion	51
4.1	Untersuchung verschiedener Endothelzellen.....	51
4.1.1	Endothelzellen und TLRs.....	51
4.1.2	Reaktion verschiedener Endothelzellen auf Stimulierung durch TLR- Liganden und Zytokine	52
4.2	Fluoreszenzmarkierung von MyD88	55
4.2.1	Methoden der Fluoreszenzmarkierung.....	55
4.2.2	Lokalisation von MyD88 bei ruhenden Endothelzellen.....	56
4.2.3	Rekrutierung von MyD88 bei TLR-Stimulierung.....	58
4.2.4	Beurteilung der variablen Darstellungsmuster.....	59
5	Zusammenfassung	62
6	Literaturverzeichnis	64
7	Anhang	72
	Abkürzungsverzeichnis.....	72
	Lebenslauf.....	76

1 Einleitung

1.1 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Die Immunabwehr besteht bei Wirbeltieren aus zwei Komponenten, der adaptiven (erworbenen) Immunität und der evolutionär konservierten angeborenen Immunität („innate immunity“). Letztere existiert bereits bei Pflanzen und Insekten und ist Bestandteil der „first line of defense“ vor der protrahiert einsetzenden Antwort der erworbenen Immunität. Die angeborene Immunität wurde zunächst vor allem durch unspezifische Reaktionen wie Phagozytose und Komplementaktivierung charakterisiert. Die Entdeckung der Toll-like Rezeptoren und ihrer Signalfortleitung durch Proteine wie MyD88 zeigten die angeborene Immunität in ihrer Eigenschaft, auf unterschiedliche Reize maßgeschneiderte Antwortreaktionen zu generieren.

Toll-like Rezeptoren gehören zu den keimbahnkodierten Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors/PRR) und erkennen selektiv pathogenassoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns/PAMPs). Bei diesen handelt es sich um invariante Muster, die sich auf einem breiten Spektrum von mikrobiellen Erregern finden und die wegen ihrer essentiellen Bedeutung für den jeweiligen Mikroorganismus phylogenetisch eine gewisse strukturelle Stabilität aufweisen. Die Interaktion von TLR und Pathogen führt über evolutionär konservierte Signalkaskaden zu einer schnellen Immunantwort mit der Induktion proinflammatorischer Zytokine und costimulatorischer Moleküle, der Reifung dendritischer Zellen sowie der Modulation der später einsetzenden adaptiven Immunantwort (1).

Ihren Namen erhielten die TLRs von dem Toll-Gen, das Anfang der 80er Jahre bei *Drosophila* entdeckt wurde und dort für die Entwicklung der dorsoventralen Achse sowie bei den erwachsenen Tieren für die Abwehr von Pilzinfektionen zuständig ist (2). Bereits 1991 wurde die Homologie in Aufbau und Signaltransduktion im Vergleich zum IL-1 Rezeptor entdeckt (3), 1997 wurde ein humaner Toll-like Rezeptor geklont und dessen immunologische Funktion nachgewiesen (4). Bei der Untersuchung der LPS-

hyposensiblen Mauslinien C3H/HeJ und C57BL/10ScCr konnte die LPS-Resistenz schließlich auf eine Punktmutation bzw. Deletion im TLR-Locus zurückgeführt werden (5, 6). Somit wurde der heutige TLR4 als Rezeptor für LPS identifiziert.

Heute sind beim Menschen zehn funktionelle Toll-like Rezeptoren (TLR1-10) bekannt. Der bei Mäusen charakterisierte TLR11 wird beim Menschen aufgrund eines Stopp-Codons im TLR11-Locus nicht exprimiert (7). Die TLRs 1, 2 und 6 sind strukturell verwandt und bilden eine Subfamilie. Eine weitere Subfamilie setzt sich aus den TLRs 7, 8 und 9, zwischen denen ebenfalls deutliche Homologien bestehen, zusammen. Strukturell sind TLRs Typ I Transmembranrezeptoren, deren extrazellulärer Bereich sich durch ein leucinreiches Wiederholungsmotiv (leucine-rich repeat/LRR) auszeichnet, das für die Bindung der Pathogene bedeutend ist. Der intrazelluläre Teil besitzt eine große Ähnlichkeit mit der intrazellulären Domäne der IL-1 Rezeptoren Familie. Diese sogenannte TIR-Domäne (Toll/IL-1 receptor homology domain) ist essentiell für die Interaktion mit dem jeweiligen Adaptermolekül und somit für die Signaltransduktion. Die meisten TLRs bilden Homodimere, TLR2 kann mit TLR1 oder TLR6 Heterodimere bilden (1, 8).

Exprimiert werden die TLRs von zahlreichen Leukozyten, die jeweils charakteristische TLR-Expressionsmuster aufweisen, darunter auch antigenpräsentierende Zellen (APCs) wie dendritische Zellen. Des Weiteren finden sich TLRs auf Gewebezellen wie Fibroblasten, Epithelien und Endothelzellen (9-11). Innerhalb der Zelle sind die Toll-like Rezeptoren an der Zelloberfläche (TLRs 1, 2, 4, 5, 6 und 10) und in intrazellulären Kompartimenten wie den Endosomen (TLRs 3, 7, 8 und 9) lokalisiert. Der dadurch begrenzte Zugang verschiedener Liganden zu den TLRs wird zunehmend als ein wichtiger Mechanismus ihrer Regulation angesehen (12). Die zelluläre wie auch subzelluläre Verteilung kann gewissen Modulationen unterliegen.

TLRs erkennen spezifisch PAMPs, die von Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen stammen. Einen Überblick über die verschiedenen Liganden der einzelnen Rezeptoren gibt Tabelle 1-1. Dabei zeigt sich, dass einige TLRs wie TLR2 ein breites Kontingent an verschiedenen Liganden erkennen, während für andere wie TLR5 nur einzelne PAMPs bekannt sind. Die spezifische Detektion vieler unterschiedlicher PAMPs durch einzelne Rezeptoren wird durch die Nutzung von akzessorischen Proteinen und im Fall von TLR2 durch die Bildung von Heterodimeren erklärt.

Tabelle 1-1: Auswahl exogener TLR-Liganden nach (1, 13, 14)

TLR	PAMP	Herkunft
TLR1/2	Triacyllipopeptide Pam ₃ CSK ₆	Bakterien/Mykobakterien synthetisch
TLR2	Lipopeptid, Lipoprotein Porine atypisches LPS Lipoarabinomannan Phospholipomannan GPI-Anker Hämagglutin-Protein unbekannt	grampositive Bakterien Neisserien gramnegative Bakterien, z.B. Porphyromona gingivalis Mykobakterien Candida albicans Trypanosomen Masernvirus CMV, HSV-1
TLR2/6	Diacyllipopeptide Lipoteichonsäure Pam ₂ CSK ₆	Mycoplasmen Gruppe B Streptokokken synthetisch
TLR3	dsRNA Poly I:C	Viren (DNA+RNA) synthetisch
TLR4	LPS Mannan Glycoinositolphospholipide Fusionsprotein Taxol	gramnegative Bakterien Candida albicans Trypanosomen respiratory syncytial-virus (RSV) synthetisch
TLR5	Flagellin	begeißelte Bakterien
TLR7	ssRNA Imiquimod, Resiquimod (R848)	RNA-Viren (IAV, HIV, VSV) synthetisch
TLR8	ssRNA Resiquimod	RNA-Viren (HIV) synthetisch
TLR9	unmethylierte CpG-DNA Hämозoin	Bakterien/Mykobakterien, Viren (HSV1, HSV2) Plasmodien
TLR10	unbekannt	unbekannt

Abkürzungen: CMV=Cytomegalie-Virus, GPI-Anker=Glycosylphosphatidylinositol-Anker, IAV=Influenza A-Virus, HIV=Humanes Immunschwäche-Virus, HSV=Herpes simplex-Virus, LPS=Lipopolysaccharid, Pam₃CSK₆= palmitoyl-3-cysteine-serine-lysine-6, Poly I:C= polyinosinic-polycytidylic acid, RSV=respiratory syncytial-virus, VSV=vesicular stomatitis-virus

Des Weiteren wurden verschiedene endogene Liganden vorgeschlagen, die als Warnsignal für Gewebeschäden zu einer Aktivierung der TLRs führen sollen. Zu diesen potentiellen Liganden gehören u.a. die Hitzeschockproteine (HSP) 60 und 70 (beide TLR2+4), Fibrinogen, Fibronectin und Heparansulfat (TLR4). Außerdem wurde mRNA als möglicher TLR3 Ligand beschrieben. Die Entdeckung, dass einige dieser Funde durch LPS-Kontaminationen entstanden sind, führte in Anbetracht der Tatsache, dass LPS TLR4 schon in minimalen Konzentrationen aktivieren kann dazu, dass die endogenen TLR-Liganden kontrovers diskutiert werden (15, 16).

In dieser Arbeit wurden die Liganden LPS (TLR4), CpG-DNA (TLR9) und Poly I:C (TLR3) zur Aktivierung von verschiedenen Endothelzellen verwendet.

LPS oder Endotoxin ist Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien. Da LPS bei den unterschiedlichen Bakterienstämmen eine große Variabilität zeigt, richten sich

die LPS Rezeptoren gegen dessen konservierte Struktur, das Lipid A. Die Gesamtstruktur des LPS-Moleküls hat aber durchaus Einfluss auf die weitere Signaltransduktion. Das in dieser Arbeit verwendete LPS (E.coli 55:B5) induziert bevorzugt den MyD88-abhängigen Signalweg (17, 18).

TLR9 kann durch bakterielle und virale DNA mit sogenannten CpG-Motiven stimuliert werden. Die DNA von Säugern ist vor einer TLR-Erkennung weitgehend geschützt, da sie weniger CpG-Motive enthält und diese zudem häufig methyliert sind. Bei der CpG-DNA werden zwei Typen unterschieden, nämlich die „konventionelle“ CpG-B/K-Typ CpG-DNA und die CpG-A/D-Typ CpG-DNA, welche in speziellen Zellarten eine verstärkte Interferonproduktion induzieren kann. Zur Aktivierung von TLR9 wurde hier synthetische DNA mit unmethyliertem CpG-Motiv, die die gleiche immunstimulatorische Wirkung wie bakterielle oder virale DNA hat und zum A-Typ gezählt wird, verwendet (19-22).

Der dritte verwendete Ligand, Poly I:C, ist das synthetische Analog von dsRNA. Diese entsteht während der Replikation von DNA- und RNA-Viren und aktiviert TLR3 (23).

1.2 Akzessorische Proteine und Adapter

Die Signalgenerierung durch Toll-like Rezeptoren kann an verschiedenen Punkten moduliert werden. Dabei helfen sowohl Corezeptoren und akzessorische Proteine bei der Interaktion mit dem Pathogen als auch unterschiedliche Adaptermoleküle in der folgenden Signaltransduktion.

Bei dem relativ gut erforschten TLR4 Rezeptor sind an der extrazellulären LPS-Erkennung mehrere Proteine beteiligt. Das aktuelle Modell der LPS-Detektion beginnt mit der Bindung von LPS-Aggregaten durch das zu den PRR gehörende Akute Phase Glykoprotein LPB (LPS-bindendes Protein). Dieses übergibt ein LPS-Monomer an den PRR CD14, der durch einen GPI-Anker membrangebunden oder frei im Plasma vorkommt. CD14 überträgt das Monomer an MD-2 (Myeloide Differenzierung-2), welches mit einer Ektodomäne von TLR4 assoziiert ist. Die folgende Bildung eines Komplexes aus LPS, MD-2 und TLR4 ist der letzte Schritt zur extrazellulären LPS-Erkennung (17). Es wurde nachgewiesen, dass MD-2 obligat für die LPS-Erkennung durch TLR4 ist (24). LBP sowie CD14 nehmen neben ihrer Funktion bei der

extrazellulären Interaktion mit LPS Einfluss auf die Signaltransduktion und haben sich dabei als notwendig für den MyD88-unabhängigen Weg erwiesen (25, 26).

CD14 ist nicht nur an der Signalgenerierung durch TLR4 beteiligt, sondern kann zusätzlich die Aktivierung des Dimers TLR1/2 durch Lipopeptide sowie die TLR3-Signaltransduktion verstärken (27, 28).

Als weitere Corezeptoren, die das TLR2 Signal verstärken, fungieren Dectin-1 und CD36. Der Lektinrezeptor Dectin-1 ist an der Erkennung von β -Glucan - einer Zellwandkomponente von Pilzen - beteiligt (29), während CD36, ein Scavenger Rezeptor, als Corezeptor die Detektion von Diacyllipoproteinen durch das Heterodimer TLR2/6 unterstützt (30).

Die Signalfortleitung der TLRs wird durch Adapterproteine vermittelt, die sich durch den Besitz einer TIR-Domäne auszeichnen. Aktuell sind fünf solcher Proteine bekannt:

- **MyD88** (Myeloider Differenzierungsfaktor 88)
- **TIRAP** = Mal
(TIR Domäne-enthaltendes Adapterprotein = MyD88-Adapter-ähnlich)
- **TRIF** = TICAM-1
(Toll/IL-1 Rezeptordomäne-enthaltender IFN- β induzierender Adapter = Toll/IL-1 enthaltendes Adaptermolekül-1)
- **TRAM** = TICAM-2
(TRIF-verwandtes Adaptermolekül = Toll/IL-1 enthaltendes Adaptermolekül-2)
- **SARM** (Sterile α und HEAT/Armadillo Motive) (31)

Das verbreitetste Adaptermolekül, MyD88, ist an der Signalfortleitung aller TLRs außer TLR3 beteiligt (32, 33). MyD88 initiiert den sogenannten „MyD88-abhängigen Signalweg“, der über eine mehrschrittige Signalkaskade und die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und IRF5 zur Induktion von Genen für die proinflammatorische Immunantwort führt. Für TLR2 und TLR4 wird der MyD88-abhängige Weg zusätzlich über TIRAP generiert, welches die Signaltransduktion zwischen TLR und MyD88 transduziert (34).

Untersuchungen von MyD88-knockout Mäusen wiesen auf die Existenz eines weiteren Signalweges hin (35). Als Mediator dieses sogenannten „MyD88-unabhängigen Signalwegs“ wurde das Adapterprotein TRIF identifiziert, welches Signale von TLR3 und TLR4 übermittelt (36). Für die Fortleitung des TLR4 Signals wird zusätzlich

TRAM benötigt (37, 38). Der MyD88-unabhängige Weg führt zu einer Aktivierung von NF- κ B in der späten Phase (35) sowie zu der Aktivierung von IRF3. Dem fünften Adapterprotein SARM wird eine spezifische inhibitorische Funktion gegenüber TRIF zugeschrieben (39).

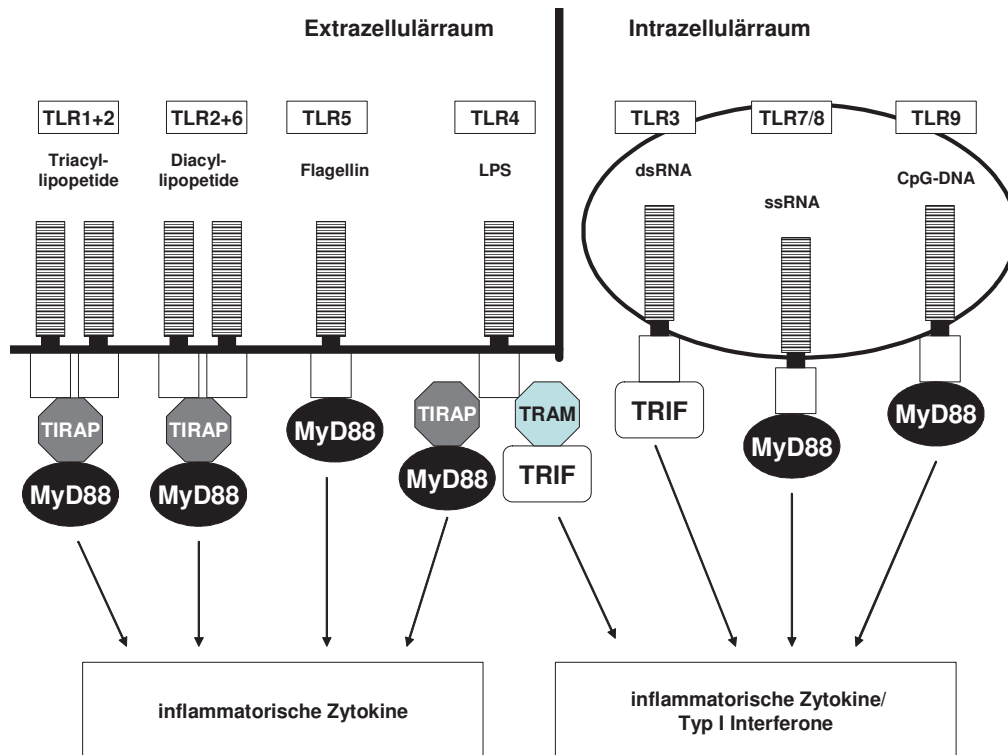


Abbildung 1: Nutzung der verschiedenen Adapterproteine im TLR-Signalweg.

Die TLRs werden in den verschiedenen zellulären Kompartimenten über ihre jeweiligen Liganden aktiviert und transduzieren ihr Signal durch die spezifische Nutzung von Adapterproteinen. Der nicht dargestellte TLR10 übermittelt sein Signal wahrscheinlich von der Zellmembran aus über MyD88 (40). TLR4 kann sein Signal sowohl über Mal/MyD88 als auch über TRAM/TRIF weiterleiten. Am Ende der Signalkaskade erfolgt die Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, bei einigen TLRs zusätzlich die Induktion von Typ I Interferonen. modifiziert nach Kawai et al. (41) (Abkürzungsverzeichnis siehe Anhang)

1.3 Subzelluläre Lokalisationen

TLRs und ihre Adapterproteine werden in für sie charakteristischen zellulären Kompartimenten exprimiert. Sie finden sich sowohl an der äußeren Plasmamembran als auch in den Zellorganellen. Dort werden subzelluläre Kompartimente wie das endoplasmatische Retikulum (ER), Endosomen und der Golgi-Apparat durch intrazelluläre Membranen abgegrenzt. Die Zellorganellen werden durch das Zytoskelett, insbesondere die Mikrotubuli, bei intrazellulären Transporten geleitet oder in ihren vorgesehenen Positionen verankert. Des Weiteren bilden die Mikrotubuli die Mitose-

spindel. Bei tierischen Zellen entspringen die Mikrotubulindimere in der Regel dem Zentrosom und strahlen von dort in das Zytoplasma aus. Das Zentrosom, dessen Keimbildungsstellen für die Tubuli aus γ -Tubulin bestehen, liegt bei Zellen, die sich nicht in der Mitose befinden, in der Nähe von Zellkern und Golgi-Apparat (42).

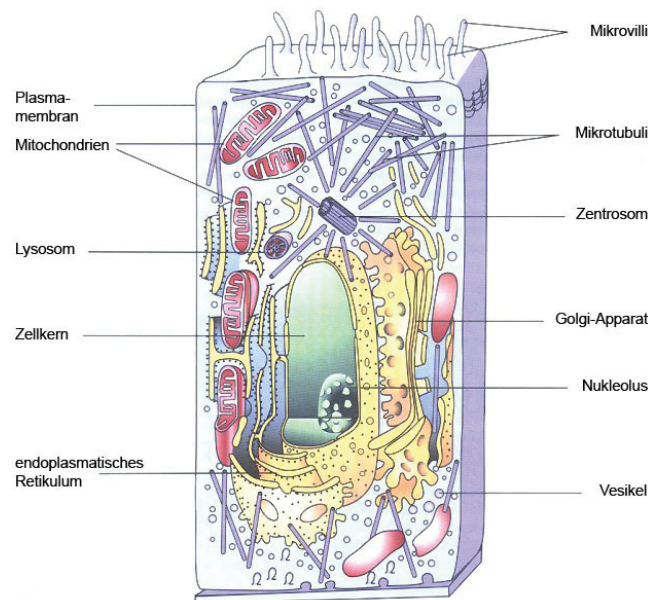


Abbildung 2: schematische Darstellung einer eukaryotischen Zelle

modifiziert entnommen aus <http://homepage.univie.ac.at/roland.sedivy/Zelle/index.html>

Die subzellulären Lokalisationen der TLRs stehen in Beziehung zu den von ihnen erkannten Liganden. Die TLRs 1, 2, 4, 5 und 6 erkennen vornehmlich Pathogene, die sich außerhalb der Zelle befinden (wie z.B. die bakterielle Zellwandkomponente LPS) und sind somit an der Zelloberfläche lokalisiert. Strukturell handelt es sich bei ihren Liganden um Proteine und Lipide. Die Nukleinsäuren-erkennenden TLRs 3, 7, 8 und 9 werden in intrazellulären Kompartimenten exprimiert. In Anbetracht der Tatsache, dass die Differenzierung der DNA von Mikroben und von Säugern schwierig ist und so wirtseigene Nukleinsäuren möglicherweise als TLR-Liganden agieren können, bietet die intrazelluläre Lokalisation einen gewissen Schutz, indem der Zugang zu den TLRs beschränkt wird (1, 43). Diese Verteilung kann jedoch in Abhängigkeit von Zelltyp und Pathogenexposition moduliert werden.

In diesem Sinne wird TLR2 bei Makrophagen nach der Interaktion mit dem Liganden Zymosan zu den Phagosomen rekrutiert (44). Beim Darmepithel wird TLR5 an der basolateralen, nicht aber der apikalen Epitheloberfläche exprimiert, sodass invasive

Mikroben, nicht aber kommensale Flora eine Immunreaktion auslösen (45). TLR4 wurde zunächst an der Oberfläche von Makrophagen nachgewiesen (46). Obwohl LPS schnell in die Zelle aufgenommen und zum Golgi-Apparat transportiert wird, erfolgt bei Makrophagen die LPS-Detektion unabhängig davon bereits an der Oberfläche (47, 48). Im Gegensatz dazu scheinen Internalisierung und Transport zum Golgi-Apparat für die LPS-Detektion von intestinalen Epithelzellen eine maßgebliche Rolle zu spielen, was ebenfalls einen Schutz vor überschießenden Reaktionen auf die physiologische Darmflora darstellen könnte (49).

Auch die intrazellulären Rezeptoren unterliegen Modulationen. TLR3 wird bei Fibroblasten nicht nur intrazellulär, sondern auch an der Oberfläche exprimiert. Intrazelluläres TLR3 wurde in speziellen Vesikeln nachgewiesen, die aber nicht den Endosomen oder Lysosomen entsprachen (50, 51). Im gleichen intrazellulären Kompartiment konnte TLR7 lokalisiert werden (52). TLR9 befindet sich innerhalb der ruhenden Zelle im ER. Wird der TLR9 Ligand CpG-DNA internalisiert, kommt es zu einer Umverteilung von TLR9 in die Endosomen und anschließend in das tubuläre lysosomale Kompartiment (53, 54). Für die Reaktion auf CpG-DNA ist die Azidifizierung der Endosomen/Lysosomen bedeutend (55). Die Notwendigkeit der endosomalen Reifung wurde ebenfalls für die Signaltransduktion der TLRs 3 und 7 nachgewiesen (51, 56). Die Untersuchung chimärischer, auf der Zelloberfläche exprimierter TLR9 Rezeptoren ließ jedoch erkennen, dass diese auch ohne eine Internalisierung des Liganden in eine Umgebung mit niedrigem pH-Wert aktiviert werden können. Zudem reagierten die chimärischen Rezeptoren auf DNA von Säugern. Dies zeigt, dass die subzelluläre Rezeptorlokalisierung von TLR9 im Sinne einer Zugangsbeschränkung eine wichtige Rolle dabei spielt, die Aktivierung durch wirtseigene DNA zu verhindern (57).

Auch die Adapterproteine können in speziellen Kompartimenten lokalisiert werden. MyD88 stellt sich in diskreten granulären Foki dar. Diese sind im Zytoplasma verteilt und weisen unterschiedliche Morphologien auf (58, 59). Das Adapterprotein TRIF ist ebenfalls im Zytoplasma nachweisbar, wo es im Gegensatz zu MyD88 aber diffus verteilt ist (60). Die beiden Adapter TIRAP und TRAM, die an der Signalübertragung von MyD88 und TRIF bei einzelnen TLRs beteiligt sind, werden im Bereich der Plasmamembran exprimiert. TRAM ist zusätzlich im Golgi-Bereich nachweisbar (58, 61).

1.4 MyD88 (myeloid differentiation factor 88)

Das MyD88 Adapterprotein wurde ursprünglich als Produkt eines neuentdeckten Gens, der Gruppe der MyD (myeloid differentiation primary response) Gene, die bei der Differenzierung von myeloiden Zellen induziert werden, charakterisiert (62). Induziert durch IL-6 folgte bei murinen M1D+ myeloleukämischen Zellen Wachstumsstillstand und Differenzierung als Konsequenz einer Aktivierung des MyD88 Gens. Diesem wurde folglich eine Rolle als Mediator der terminalen myeloiden Differenzierung zugeschrieben (63).

1994 wurde die Homologie zwischen der C-terminalen Region von MyD88 und den intrazellulären Domänen der Toll/IL-1 Rezeptorfamilie, der TIR-Domäne, entdeckt (64). Im Gegensatz zu den bekannten TIR-Domänen enthaltenden Proteinen wurde MyD88 aber als rein zytoplasmatisches Protein charakterisiert, das außerdem eine Todesdomäne (Death domain/DD) besaß. Zusätzlich konnte die anfangs nur in myeloiden Zellen beschriebene MyD88-mRNA in einer Vielzahl von adulten humanen Geweben nachgewiesen werden (65). Humanes MyD88 konnte schließlich als Adapter für die Toll- und IL-1 Signalkaskade im Menschen charakterisiert werden. Es detektiert mit seiner C-terminalen TIR-Domäne Signale von TLR und IL-Rezeptor und leitet mit seiner N-terminalen Todesdomäne die weitere Signalkaskade ein (66-68).

1.5 MyD88-abhängige Signalkaskade

Alle TLRs außer TLR3 können durch den MyD88-abhängigen Signalweg über die Translokation der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und IRF5 in den Zellkern zur Induktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-6 und IL-12 führen (69) (siehe Abbildung 3).

Nach der Bindung eines Pathogens bilden die TLRs Dimere und führen so eine Konformationsänderung herbei, die die Rekrutierung des TIR-Domänen enthaltenden Proteins MyD88 erlaubt. MyD88 assoziiert mit der zytoplasmatischen Domäne der TLRs durch eine homophile Interaktion beider TIR-Domänen. Bei der Transduktion von Signalen der TLRs 2 und 4 wird diese Interaktion durch das Adapterprotein TIRAP vermittelt (70). MyD88 rekrutiert durch seine Todesdomäne die Serin/Threoninkinasen IRAK4 und IRAK1, die ebenfalls eine Todesdomäne besitzen welche eine homophile Interaktion mit der entsprechenden Domäne von MyD88 eingehen. Das aktivierte

IRAK4 phosphoryliert IRAK1 (71-73). Daraufhin assoziieren beide mit TRAF6 (74, 75). TRAF6 ist eine Ubiquitin-Ligase und kann zusammen mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzymkomplex Ubc13/Uev1A spezielle Polyubiquitinketten bilden. Diese K63-Polyubiquitinkette mit regulatorischen Funktionen wird an TRAF6 selbst und IKK γ konjugiert. Sie ist an den Ubiquitin-Lysinrest 63 gebunden und markiert im Gegensatz zur K48-Polyubiquitierung nicht zum proteasomalen Abbau (76, 77). Das ubiquitinylierte TRAF6 aktiviert und rekrutiert TAK1, ein Mitglied der MAP3K-Familie und dessen Bindungsproteine TAB1 und TAB2 bzw. dessen Homolog TAB3 (78-80). TAK1 phosphoryliert die MAPK Kinase 6 (MKK6), die über die MAPKs p38 und Jnk zur Aktivierung von AP-1 führt. Außerdem phosphoryliert TAK1 den IKK-Komplex (81, 82). Der IKK-Komplex besteht aus der regulatorischen Untereinheit IKK γ (= NEMO) sowie den beiden katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β . Die Phosphorylierung von IKK β durch TAK1 aktiviert den IKK-Komplex, der wiederum I κ B α phosphoryliert. I κ B α , welches mit NF- κ B interagiert und dieses so im Zytoplasma hält, wird durch die Phosphorylierung für die K48-Polyubiquitierung und damit für den proteasomalen Abbau markiert. Dadurch wird NF- κ B frei und gelangt in den Nukleus (83).

Als dritter Transkriptionsfaktor im MyD88-abhängigen Signalweg wird IRF5 aktiviert. Die TLR Stimulation induziert die Bildung eines Komplexes aus MyD88, TRAF6 und IRF5. Dies führt zu der Aktivierung von IRF5 und dessen Translokation in den Zellkern (84, 85).

Ein spezieller MyD88-abhängiger Signalweg existiert in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs). Diese Unterart der dendritischen Zellen exprimiert die TLRs 7 und 9 im endosomalen Kompartiment und ist in der Lage, bei Stimulation hohe Mengen Typ I IFN zu bilden (86, 87). Dies geschieht ebenfalls in einem MyD88-abhängigen Signalweg. Nach Aktivierung der TLRs bildet IRF7 einen Komplex mit MyD88, IRAK1, IRAK4 und TRAF6. Das aktivierte IRF7 transloziert darauf in den Nukleus und vermittelt die Induktion von Typ I IFN-Genen (60, 88, 89).

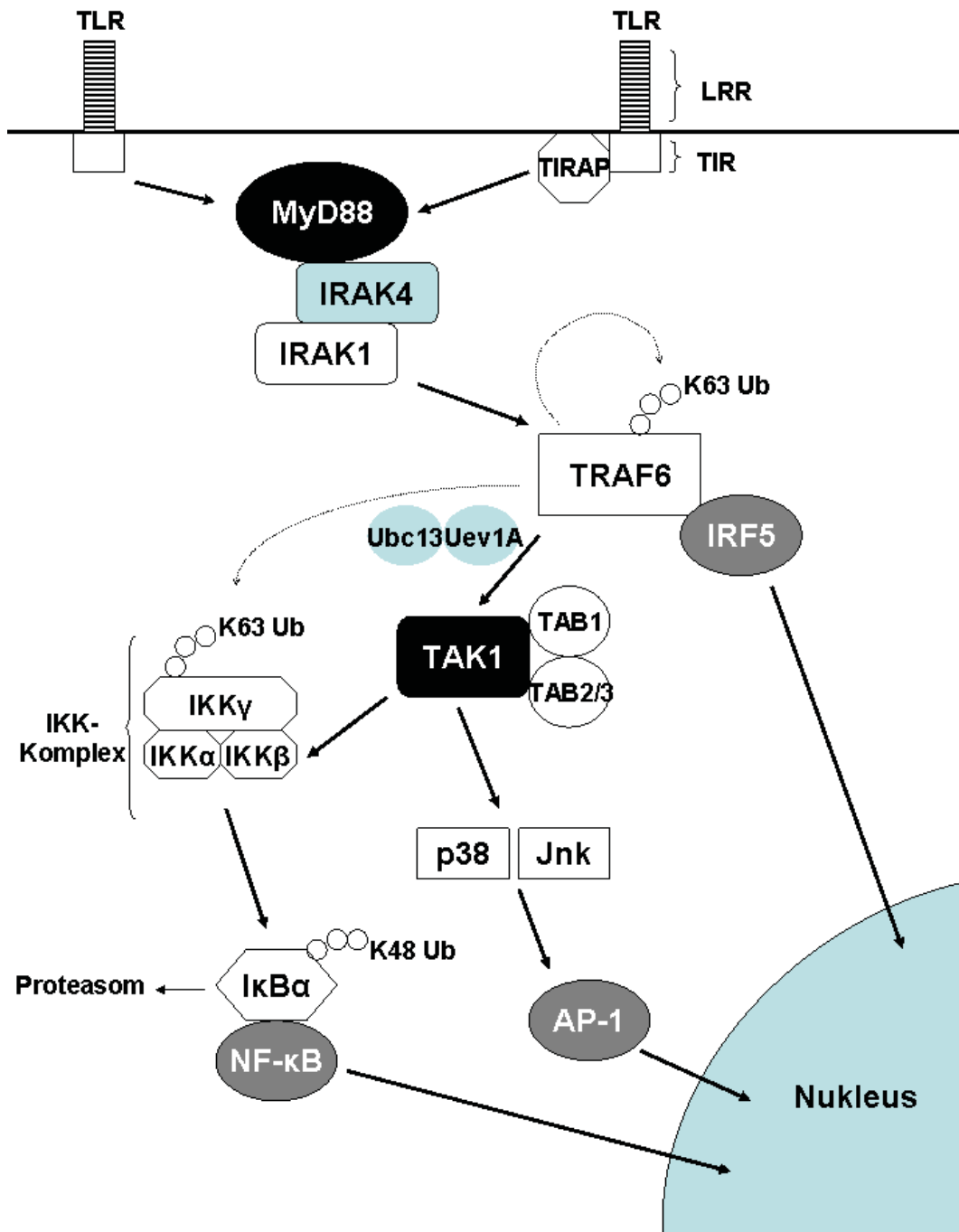


Abbildung 3: MyD88-abhängige Signalkaskade

Nach der Bindung eines Liganden rekrutieren die TLRs MyD88 (bei TLR4 mediert über TIRAP). Es folgt die sequentielle Aktivierung von IRAK4, IRAK1 und TRAF6. TRAF6 katalysiert zusammen mit dem Enzymkomplex Ubc13/Uev1A die Bildung einer K63-Polyubiquitinkette an TRAF6 selbst und IKK γ und aktiviert den TAK1-Komplex (TAK1, TAB1, TAB2/3). TAK1 phosphoryliert und aktiviert IKK β , welches wiederum I κ B α phosphoryliert. Dieses wird so über die K48-Polyubiquitierung zum proteasomalen Abbau markiert, wodurch NF- κ B freigesetzt wird. TAK1 führt außerdem über die MAP-Kinasen p38 und Jnk zu der Aktivierung von AP-1. Zusätzlich wird IRF5 durch Bildung eines Komplexes mit MyD88 und TRAF6 aktiviert. Die drei Transkriptionsfaktoren translozieren in den Zellkern und vermitteln die Induktion der pro-inflammatorischen Reaktion. (Abkürzungsverzeichnis siehe Anhang)

1.6 Klinische Bedeutung

Die TLRs und ihre Signalgebung werden mit einer Vielzahl von Erkrankungen in Verbindung gebracht. Genpolymorphismen und Defekte können eine vermehrte Krankheitsanfälligkeit vermitteln, andererseits jedoch auch eine Schutzfunktion ausüben. Außerdem wird ihre Rolle bei der Genese von Autoimmunität diskutiert. Ein wichtiger Aspekt ihrer klinischen Bedeutung ist aber auch die Fähigkeit, die adaptive Immunantwort in einem Prozess, bei dem dendritische Zellen eine tragende Rolle spielen, einzuleiten (90). Die Modulation der adaptiven Immunität durch TLRs gibt dabei wichtige Hinweise auf die Funktion bekannter Impfstoffe und bietet Ansätze, neue Vakzine in ihrer Wirksamkeit zu optimieren (91, 92). TLR-Signale haben Einfluss auf die Differenzierung von T-Helfer-Zellen (T_H). Diese können als T_H1 -Zellen die zelluläre Immunität begünstigen oder als T_H2 -Zellen IgE-Produktion und Eosinophilie stimulieren. TLRs beeinflussen die T_H1/T_H2 -Balance, wobei die meisten TLR-Liganden eine T_H1 -Differenzierung induzieren. In dieser Eigenschaft könnten die TLRs eine wichtige Rolle in der Pathogenese allergischer Erkrankungen spielen (93, 94). Der Immunmodulator Imiquimod, der lokal z.B. zur Behandlung von Basalzellkarzinomen eingesetzt wird, ist ein TLR7-Agonist. Seine antivirale und antitumoröse Wirkung wird mechanistisch zu einem großen Anteil der Induktion einer Immunantwort des T_H1 -Phänotyps zugeschrieben (95, 96). Somit stellt die Modulation des adaptiven Immunsystems durch TLRs vielfältige Ansätze für Krankheitsprophylaxe und Therapie bereit.

Über Polymorphismen, Defekte in der Signalkette und übermäßige Aktivität wird eine Rolle der TLRs bei so unterschiedlichen Erkrankungen wie z.B. Sepsis, SLE (systemischer Lupus erythematosus) oder Arteriosklerose diskutiert. So wurde dokumentiert, dass sowohl TLR4 als auch TLR2 an der Entstehung von Arteriosklerose beteiligt zu sein scheinen und bei MyD88-Defizienz eine signifikante Abnahme der Größe arteriosklerotischer Plaques festgestellt werden kann (97, 98). Polymorphismen von TLR4, TLR2 sowie IRAK4 werden mit der Inzidenz und Progression der Sepsis in Verbindung gebracht (99, 100).

Auch bei der Pathogenese von SLE wird eine Beteiligung der Toll-like Rezeptoren, speziell TLR7 und 9 diskutiert. SLE ist gekennzeichnet durch B-Zell-Überaktivität und die Produktion von Autoantikörpern gegen Nukleinsäuren/Proteinkomplexe wie

Chromatin (enthält dsDNA und Histone) und snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins). Hohe Interferon- α Spiegel korrelieren mit der Krankheitsaktivität. Die frühe Pathogenese konnte mit der beeinträchtigten Beseitigung von extrazellulärem apoptotischen Zellmaterial in Zusammenhang gebracht werden, welches somit eine Autoantigenquelle darstellt. Extrazelluläre Nukleinsäuren können von den entsprechenden TLRs als Ligand erkannt werden, die aber als Schutz vor ungewünschter Aktivierung intrazellulär lokalisiert sind. Werden die Nukleinsäuren von autoimmunen B-Zellen über den B-Zell Rezeptor aufgenommen und so internalisiert, können sie zusätzlich die endosomal lokalisierten TLR7 und 9 aktivieren und so die B-Zelle zur Produktion von Autoantikörpern mit der folgenden Bildung von Immunkomplexen anregen. Diese Immunkomplexe können von plasmazytoiden dendritischen Zellen, welche bei Aktivierung hohe Mengen an IFN- α produzieren können, über den Fc γ RIIa Rezeptor aufgenommen werden und so die intrazellulären TLRs zur Induktion von Zytokinen und Chemokinen mit vielfältiger systemischer Wirkung anregen. Verschiedene Untersuchungen von knockout Mäusen der entsprechenden TLRs zeigten jedoch widersprüchliche Ergebnisse, sodass sich eine tragende Rolle für TLRs in der SLE-Pathogenese bisher nicht nachweisen ließ (101, 102).

1.7 Endothelzellen

Endothelzellen (ECs) sind als biologisch aktive Barriere zwischen Blutbahn und Gewebe an einer Vielzahl von physiologischen Funktionen beteiligt. Eine wichtige Rolle spielen sie auch bei inflammatorischen Reaktionen durch die Rekrutierung von Leukozyten an den Ort von Infektion oder Gewebeschädigung sowie durch die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und sind somit ein wichtiger Bestandteil der natürlichen Immunität. In Einklang dazu konnten bereits auf verschiedenen Endothelzellen TLRs nachgewiesen werden. Dazu gehören pulmonale, dermale, intestinale und koronare Endothelzellen sowie Endothelien lymphatischer Gefäße (103-105). Zusätzlich zu ihrer Differenzierung nach Organherkunft können als strukturelles Merkmal die Endothelzellen kleiner Gefäße (mikrovaskuläre Endothelzellen) und die großer Gefäße (makrovaskuläre Endothelzellen) unterschieden werden.

Nimmt man Endothelzellen als Versuchsmodell, so ist zu berücksichtigen, dass sie in Abhängigkeit von ihrer Herkunft innerhalb des Körpers spezialisierte Aufgaben haben und somit eine deutliche Heterogenität in Struktur und Funktion zeigen. In dieser Arbeit wurden deshalb eine makrovaskuläre und eine mikrovaskuläre Endothelzelllinie sowie primäre mikrovaskuläre Zellen untersucht. Gleichzeitig handelt es sich dabei um Zellen unterschiedlicher Gewebeherkunft:

Bei den EA.hy 926 handelt es sich um eine makrovaskuläre Hybridom-Zelllinie, die aus der Fusion primärer Nabelschnurendothelien, den HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) und der humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549 entstand (106).

Die mikrovaskulären HMEC-1 (humane mikrovaskuläre Endothelzellen) wurden durch die Transfektion von primären Hautendothelzellen mit einem auf pBR322-basierenden Plasmid, das die kodierende Region für das große T-Antigen des SV40 (Simian Virus 40) enthält, immortalisiert. Sie bieten die charakteristischen Eigenschaften mikrovaskulärer Endothelzellen wie die Sekretion von vWF und Aufnahme von acetyliertem LDL (107).

Um primäre Zellen handelt es sich bei den HDMEC (humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen), welche zugleich die primären Zellen der HMEC-1 sind.

1.8 Interleukin-8

Interleukin-8 (= CXCL-8) ist ein chemotaktisches Zytokin, das zur Subgruppe der CXC-Chemokine gehört. Diese Gruppe wird strukturell durch zwei aminoterminalen Cysteinreste, welche durch eine Aminosäure verbunden sind charakterisiert (Cystein-X-Cystein). Funktionell gehört IL-8 zu den inflammatorischen Chemokinen, deren Sekretion bei der frühen Entzündungsreaktion induziert wird. IL-8 wird v.a. von Immunzellen wie aktivierten Monozyten aber auch von einer Vielzahl von nichtimmunologischen Zellen, insbesondere Endothelzellen gebildet (108). Die Freisetzung von IL-8 wird durch zahlreiche Stimuli initiiert, darunter TNF- α , IL-1 β und auch LPS (109). Bei gesunden Probanden konnten nach intravenöser LPS-Gabe maximale IL-8 Spiegel 2-3 Stunden nach Injektion dokumentiert werden (110). Aufgrund dieser Voraussetzungen ist IL-8 ein geeigneter Parameter zur Messung der inflammatorischen Reaktion von Endothelzellen in vitro.

Das IL-8 Signal wird durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die ebenfalls auf zahlreichen Zelltypen exprimiert werden, transduziert. Dabei bindet IL-8 sowohl an

einen IL-8 spezifischen als auch an einen CXC-gruppenspezifischen Rezeptor. Als inflammatorisches Chemokin rekrutiert IL-8 neutrophile Granulozyten und Monozyten durch Bildung eines chemotaktischen Gradienten an den Ort der Entzündung. Des Weiteren vermittelt IL-8 auch Aktivierung und Degranulation von neutrophilen Granulozyten.

Aufgrund seiner Wirkung auf neutrophile Granulozyten wurde für IL-8 früh eine Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis diskutiert. Tatsächlich zeigte es sich, dass bei septischen Patienten erhöhte IL-8 Spiegel zu finden sind und dass diese Spiegel in Korrelation mit prognostisch relevanten klinischen und laborchemischen Parametern stehen. Aktuell stellt IL-8 deshalb einen möglichen Parameter zur Prognose sowie zur Früherkennung einer Sepsis bzw. bakteriellen Infektion, v.a. in der Neonatologie dar (109, 111). Außerdem wird eine Rolle in anderen entzündungsassoziierten Krankheitsbildern wie auch in der Pathogenese der Arteriosklerose vermutet (112). Abgesehen von seiner inflammatorischen Funktion wurde für IL-8 eine Beteiligung bei der Angiogenese beschrieben und des Weiteren die Stimulation des Wachstums von Tumorzellen diskutiert (113).

1.9 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte die Rekrutierung des (TLR-)Adapterproteins MyD88 in die verschiedenen zellulären Kompartimente nach Aktivierung mit TLR-Liganden dargestellt werden.

Als Versuchsobjekt wurden Endothelzellen, die aufgrund ihrer Lage im Organismus als Barriere zwischen Blutbahn und Gewebe eine Schlüsselrolle bei der Entzündungsreaktion spielen, ausgewählt. In vorausgehenden Experimenten konnten bereits die Expression aller TLRs auf Endothelzellen charakterisiert werden. Da bei den verschiedenen Endothelzellen heterogene Reaktionen zu erwarten sind, wurden hier makro- und mikrovaskuläre Endothelzellen unterschiedlicher Organherkunft bezüglich ihrer Reaktion auf ausgewählte TLR-Liganden untersucht. Es stellt sich die Frage, ob bei den untersuchten Endothelzellen (HDMEC, HMEC-1, EA.hy 926) in der Reaktion auf verschiedene TLR-Liganden signifikante Unterschiede festzustellen sind.

Bezüglich der Darstellung der subzellulären Verteilung von MyD88 sollte besonderer Wert auf die Darstellung des endogenen Proteins gelegt werden. In der aktuellen Literatur wird mit einer Ausnahme ausschließlich GFP zur Darstellung von MyD88 verwendet, sodass dabei überexprimiertes GFP/MyD88-Fusionsprotein, aber kein

endogenes MyD88 untersucht wird. Hier war es die Zielsetzung, über eine Immunfluoreszenzmarkierung ausschließlich endogenes MyD88 darzustellen. Dieses sollte zunächst innerhalb der ruhenden Zelle untersucht werden, um im Folgenden erstmalig dessen Umverteilung nach der Bindung von verschiedenen TLR-Liganden darzustellen. Augenmerk sollte dabei sowohl auf das ligandenabhängige Verteilungsmuster sowie den Zeitrahmen, in dem diese Umverteilung geschieht, gelegt werden. In Vergleich mit bereits veröffentlichten Arbeiten stellte sich die Frage, inwiefern die Ergebnisse für überexprimiertes MyD88/GFP-Fusionsprotein und endogenes MyD88 in der initialen Verteilung bzw. des zeitlichen Ablaufs der ligandeninduzierten Umverteilung differieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav	Gössner, Hamburg
Brutschränke: - Heraeus® HERAcell® - IG 150	Thermo Electron, Langenselbold, Jouan, Saint Herblain, Frankreich
Einfrierbox	Nallgene, Rochester (NY), USA
Eppendorf Multipette 4780	Eppendorf, Hamburg
Mikroskope: - Axioplan, Axioplan 200 - Leica TCS SP2 AOBS	Zeiss, Jena Leica, Wetzlar
Mikroskop-Kamera: RT-Color SPOT	Diagnostic Instruments, Sterling Heights (MI), USA
Multifunktionsplattenleser: Flurostar-Optima	BMG, Offenburg
pH-Meter	Knick, Berlin
Sterilbänke: EF5EC, Sterilbank Euroflow	Clean Air, Woerden, Niederlande
Tischzentrifuge: 5415D	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallprozessor: UP50H	Dr. Hielscher Ultrasonics, Teltow
Waagen: Feinwaage AG285, Waage E200	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Wasserbad: Thermomix RU	Braun, Melsungen
Zellzentrifuge: Allegra 6KR	Beckmann Coulter, Fullerton (CA), USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

96-Well Platte (ELISA)	Nunc, Wiesbaden
96-Well Platte (Protein-Assay)	Greiner, Frickenhausen
Chamber Slide 8-Well Objektträger (Glas)	Nunc, Wiesbaden

Falcons (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Pipetten (2 ml)	Greiner, Frickenhausen
Pipetten (5 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipetten (10 ml, 25 ml)	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen (10 ml, 50 ml)	Braun, Melsungen
Sterilfilter (0,2 µm)	Sartorius, Göttingen
Zellkulturplatten (6-Well, 12-Well)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturschale (10 cm)	Greiner, Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DABCO	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethyldiamintetraessigsäure	Merck, Darmstadt
EuKitt	Kindler, Freiburg
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Mowiol	Calbiochem, Schwalbach
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxychololat	Sigma-Aldrich, Steinheim

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Nonidet P-40 (NP40)	Fluka, Seelze
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Proteaseinhibitortabletten (Complete™Mini)	Roche, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20x	Fluka, Seelze
Schwefelsäure	Fluka, Seelze
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

2.1.4 Puffer und Lösungen

PBS (pH 7,4)	
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM

PFA 8 % (pH 7,4) (= Paraformaldehyd)	
PBS	300 ml
PFA	40 g
Aqua bidest. ad 500 ml	
Lagerung bei - 20 °C	

PBS/0,02%EDTA (pH 7,4)	
10x PBS	100 ml
EDTA	200 mg
Aqua bidest. ad 1000 ml	

TBS (pH 7,8)	
Tris	20 mM
NaCl	150 mM

PBST (pH 7,4)	
10x PBS	100 ml
Triton-X-100	1 g
Aqua bidest. ad 1000 ml	

ELISA (pH 7,2-7,4)

Reagent Diluent	Waschpuffer	Blockpuffer
TBS + 0,1 % BSA + 0,05 % Tween	PBS + 0,05 % Tween	PBS + 1 % BSA + 0,05 % NaN ₃

RIPA-Puffer (pH 7,4)

PBS 10x 10 ml

NP40 1 %

Natriumdesoxycholat 0,5 %

SDS 0,1 %

Aqua bidest. ad 100 ml

Unmittelbar vor der Anwendung Zugabe
von 1 Tablette Proteinaseinhibitor /10 ml

2.1.5 Zellkultur

2.1.5.1 Zellen

EA.hy 926

CJS Edgell, University of North Carolina,
Chapell Hill (NC), USA

HDMEC

PromoCell, Heidelberg

HMEC-1

CDC, Atlanta (GA), USA

2.1.5.2 Materialien für die Zellkultur

Amphotericin B

PromoCell, Heidelberg

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Merck, Darmstadt

EGF (Epidermal Growth Factor)

PromoCell, Heidelberg

Endothelial Cell Basal Medium MV

PromoCell, Heidelberg

FBS/FCS: Foetal Bovines Serum

PAA, Pasching, Österreich

„GOLD“ (Endotoxin $\leq 2,4$ ng/ml)	
„Clone“ (Endotoxin $\leq 0,45$ ng/ml)	
GlutaMAX 100x (L-Alanyl-L-Glutamin)	Gibco, Gaithersburg, USA
HAT/ HT-Supplement	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hepes	PAA, Pasching, Österreich
Hydrocortison	Biochrom, Berlin
MCDB 131	Gibco, Gaithersburg, USA
MEM 100x (nicht-essentielle Aminosäuren)	PAA, Pasching, Österreich
Natriumpyruvat	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
SupplementPack/Endothelial Cell Basal Medium MV (FCS, ECGS/H, EGF, HC)	PromoCell, Heidelberg
Trypsin 1x	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin/EDTA 1x	PAA, Pasching, Österreich

2.1.6 Zellaktive Substanzen

CpG-DNA Sequenz (5`-3`): ggTGCATCGATGCAGgggggG	Sigma-Aldrich, Steinheim
LPS (E. coli 55:B5)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly I:C	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
rekombinantes humanes IFN- γ	Strathmann, Hamburg
rekombinantes humanes IL-1 β	Strathmann, Hamburg
rekombinantes humanes TNF- α	Strathmann, Hamburg

2.1.7 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

primäre Antikörper

Epitop	Wirt		Firma
CD14	Maus	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
CD36	Maus	monoklonal	Abcam, Cambridge, UK
γ -Tubulin	Maus	monoklonal	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glucose-Oxidase (Negativ-Kontrolle)	Maus	monoklonal	DakoCytomation, Hamburg
MyD88 _(C-terminales Peptid)	Kaninchen	polyklonal	eBioscience/NatuTec, Frankfurt/Main
MyD88 _(internes Peptid)	Kaninchen	polyklonal	EBioscience/NatuTec
TLR1, 3, 4, 6, 7, 9	Ziege	polyklonal	Santa Cruz
TLR2, 5, 8	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz
TLR10	Maus	monoklonal	Alexis, Grünberg
vWF	Kaninchen	polyklonal	Sigma-Aldrich

sekundäre Antikörper/Fluoreszenzfarbstoffe

Alexa Fluor 488-gekoppelter Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)-AK	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488-gekoppelter Huhn anti-Kaninchen IgG (H+L)-AK	Molecular Probes
Alexa Fluor 594-gekoppelter Ziege anti-Maus IgG (H+L)-AK	Molecular Probes
Alexa Fluor 647-gekoppeltes Lectin-HPA Konjugat	Molecular Probes
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.8 Kits

DC Protein Assay	Bio-Rad, München
DuoSet ELISA Development Kit (human IL-8) Substrate Reagent Pack	R&D Systems, Minneapolis, USA
Universal LSAB+ Kit, Peroxidase Liquid DAB Chromogen	DakoCytomation, Hamburg

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kulturbedingungen

Für die Versuche wurden primäre Endothelzellen sowie zwei Zelllinien verwendet. Alle Zellarten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert:

HMEC-1 (humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen)

Die Kultivierung der Zelllinie (HMEC-1+) erfolgte in

MCDB 131 mit	
10 %	Fetal Calf Serum „Gold“ (Endotoxin ≤ 2,4 ng/ml)
1 %	Penicillin/Streptomycin
2 mM	L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMax I)
10 ng/ml	EGF (Epidermal Growth Factor)
1 µg/ml	Hydrocortison

Außerdem wurden zusätzlich HMEC-1 ohne EGF und Hydrocortison weiterkultiviert, die ab der 2. Passage ohne diese Zusätze für separate Versuche verwendet wurden (HMEC-1o).

Insgesamt wurden die HMEC-1 bis Passage 24 für die beschriebenen Versuche verwendet.

EA.hy 926

Kultiviert wurden die Zellen der Hybridom-Zelllinie in

RPMI 1640 ohne L-Glutamin mit	
10 %	Fetal Calf Serum „Clone“ (Endotoxin \leq 0,45 ng/ml)
1 %	Penicillin/ Streptomycin
2 mM	L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMax I)
1 %	Nicht-essentielle Aminosäuren
1 mM	Natriumpyruvat
20 mM	Hepes
1x/500 ml	HT-Supplement (Hypoxanthin 6,8 mg, Thymidin 1,94 mg)

Verwendet wurden die EA.hy 926 bis zur Passage 61.

Die Zellen wurden monatlich für 1 - 2 Passagen in einem Kulturmedium mit dem Zusatz von HAT (Hypoxanthin 6,8 mg, Aminopterin 0,088 mg, Thymidin 1,94 mg pro 500 ml Vollmedium) inkubiert. Das darin enthaltene Aminopterin blockiert die Dihydrofolatreduktase und damit die DNA-Synthese. Auf die Weise werden Zellen, die die HPGRTase (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) und TK (Thymidin-Kinase) besitzen und so Purine über den Wiederverwertungsweg („salvage pathway“) synthetisieren können, selektiert.

HDMEC (humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen)

Bei den beschriebenen Versuchen wurden primäre Endothelzellen aus Vorhautzellen eines 7 Jahre alten Spenders kaukasischer Abstammung verwendet.

Für die Versuche wurden die Zellen bis zur 8. Passage verwendet.

Das Kulturmedium bestand aus

Endothelial Cell Basal Medium MV	
5 %	Fetal Calf Serum (FCS)
0,4 %	Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin
1 %	Penicillin/Streptomycin

10 ng/ml	Epidermal Growth Factor (EGF)
1 µg/ml	Hydrocortison
50 ng/ml	Amphotericin B

2.2.1.2 Kultivierung

Nach dem Waschen der adhärennten Zellen mit PBS/0,02 % EDTA (HDMEC: reines PBS) wurde 1 ml Trypsin/EDTA (EA.hy 926: Trypsin ohne EDTA) pro 10 cm Platte zugegeben und für wenige Minuten bei 37 °C inkubiert (HDMEC: Inkubation bei RT). Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurde die Trypsinaktivität durch Zugabe von 10 ml Medium/FCS gestoppt. Nach 5-minütigem Abzentrifugieren bei 1000 rpm (HMEC-1: 1500 rpm aufgrund der kleineren Zellkörper) wurde das Zellpellet im jeweiligem Vollmedium resuspendiert und in gewünschter Zellzahl (durch Auszählen in der Neubauer-Zählkammer) für Versuche oder die weitere Kultivierung ausgesät.

2.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden proliferierende Zellen wie in 2.2.1.2 beschrieben behandelt und das Zellpellet anschließend in reinem FCS resuspendiert. Das vorgekühlte Einfriermedium (Kulturmedium/10 % DMSO) wurde in einem Mengenverhältnis von 1:1 mit der FCS-Suspension gemischt, sodass ein Gesamtvolumen von etwa 1 ml pro vollständig bedeckter 10 cm Zellkulturschale entstand. Die Zellsuspension wurde in einer Kryobox (Cryo 1°Freezing Container) bei - 80 °C eingefroren und schließlich bei - 80 °C weitergelagert.

2.2.1.4 Auftauen eingefrorener Zellen

Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, wegen des toxischen DMSO sofort in Medium suspendiert und zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspension im jeweiligen Vollmedium und die Aussaat zur weiteren Kultur. Dabei wurden die Zellen je eines Kryoröhrchens auf eine 10 cm Zellkulturschale gegeben.

2.2.1.5 Aussaat für Versuche

Für die Versuche wurden die Zellen in 12-Well Platten für den IL-8 ELISA sowie auf 8-Well Objektträgern aus Glas für die Immunfluoreszenz und Immunocytochemie ausgesät. Die ausgesäte Zellmenge, die in Tabelle 2-1 angegeben ist, unterschied sich nach Zellgröße und Proliferationsgeschwindigkeit.

Bei der Aussaat für den ELISA wurde bei Semikonfluenz mit der Aktivierung begonnen. Die Immunfluoreszenz (IF) wurde einen Tag nach der Aussaat, die Immunzytochemie (ICC) bei annähernder Konfluenz der Zellen durchgeführt.

Tabelle 2-1: Zellzahl pro Well der verschiedenen Endothelzellen für ICC, IF und ELISA

	EA.hy 926	HDMEC	HMEC-1+	HMEC-1o
ICC	15.000	Ø	Ø	Ø
IF	15.000	12.000	15.000	20.000
ELISA	82.000	105.000	105.000	185.000

2.2.1.6 Aktivierung durch Zytokine und spezifische TLR-Liganden

Für den ELISA wurden die Zellen durch TLR-Agonisten und proinflammatorische Zytokine aktiviert. Dabei wurden die Zellen nach dem Waschen mit PBS für 6 h mit den TLR-Liganden Poly I:C (c = 50 µg/ml), CpG-DNA (c = 1 µM) und LPS (c = 100 ng/ml) versetzt, die in Medium zu den jeweiligen Zielkonzentrationen verdünnt worden waren. Poly I:C und CpG-DNA wurden nach Herstellerangaben gelöst und anschließend bei - 20 °C aufbewahrt. LPS wurde bei 4 °C aufbewahrt und vor Gebrauch 3 × 10 s mit Ultraschall behandelt, um eine Mizellenbildung, die die Immunogenität des LPS vermindern würde, zu verhindern.

Die Hälfte der Wells wurde zuvor zusätzlich mit der Kombination von TNF-α, IFN-γ und IL1-β (jeweils c = 1000 U/ml) für 24 h inkubiert. Nach der 6-stündigen Inkubation mit den TLR-Liganden wurden die Überstände abpipettiert, die Überstände gleich behandelte Wells gepoolt, aliquotiert und bis zur Auswertung mittels IL-8 ELISA bei - 80 °C eingefroren.

Nach dem Entfernen der Überstände wurden die für den ELISA verwendeten Wells mit je 1 ml PBS gewaschen und anschließend folgte eine Lyse der Zellen durch Zugabe von RIPA-Puffer. Die entstandenen Lysate gleicher Vorbehandlung wurden gepoolt, aliquotiert und bis zur weiteren Analyse durch den Protein-Assay (siehe 2.2.5) bei - 80 °C eingefroren.

Für die IF erfolgte eine spezifische Aktivierung durch Poly I:C, CpG-DNA und LPS in gleicher Konzentration wie beim ELISA für 5 min, 10 min und 4 h. Unmittelbar danach wurden die Zellen auf dem Objektträger fixiert und durch IF angefärbt (siehe 2.2.3).

Die Zelllinie EA.hy 926 reagierte sensibel auf einen Austausch des kompletten Mediums. Deshalb wurden die Liganden sowohl für EA.hy 926 als auch für HMEC-1 und HDMEC in einer Mischung aus frischem und konditioniertem Zellkulturmedium auf ihre Zielkonzentration verdünnt.

2.2.2 Immunzytochemie (ICC)

Verwendet wurde das DakoCytomation LSAB+ Kit. Der hier enthaltene sekundäre biotinylierte Antikörper („Link“) richtet sich gegen primäre Antikörper aus Maus, Kaninchen oder Ziege. Die in diesem Experiment verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2-2 aufgelistet. An das Biotin des Link-Antikörpers bindet das anschließend zugegebene konjugierte Streptavidin-HRP, welches vier Bindungsstellen für Biotin besitzt. Die 3,3'-Diaminobenzidin enthaltenden Substrat-Chromogen-Lösung bildet durch Reaktion mit der an das Streptavidin konjugierten Meerrettich-Peroxidase (HRP) die endgültige Färbung aus.

Zur immunzytochemischen Färbung wurden die mit angewachsenen Zellen bedeckten 8-Well Objektträger unter kaltem Luftstrom getrocknet und direkt weiterbehandelt oder bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für maximal eine Woche eingefroren. Die Fixierung erfolgte durch ein 10-minütiges Acetonbad. Danach wurde mit einer 5-minütigen Inkubation in 0,3 % H_2O_2 fortgefahren, um eine endogene Peroxidase-Aktivität zu unterdrücken. Nach dem Waschen mit TBS wurden die Präparate für $>30\text{ min}$ mit TBS/1 % BSA abgedeckt, um unspezifischen Bindungen entgegenzuwirken. Nach erneutem Waschen wurden jeweils $100\text{ }\mu\text{l}$ der in TBS verdünnten primären Antikörper aufpipettiert und für 40 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Als Negativkontrolle diente eine Universal-Negativkontrolle von Dako, ein Maus IgG1-Antikörper, der sich gegen die in Säugetieren nicht vorkommende Glucose-Oxidase des Pilzes *Aspergillus niger* richtet. Auf einen weiteren Waschschrift folgte die 15-minütige Inkubation mit dem biotinylierten Link-Antikörper, ein Waschschrift und eine 15-minütige Inkubation mit Streptavidin-HRP. Die Objektträger wurden gewaschen, anschließend für 5 min mit der Substrat-Chromogen-Lösung bedeckt und dann erneut gewaschen.

Für die Lichtmikroskopie wurden die Präparate zusätzlich etwa 20 s in Hämatoxylin gebadet, mit Leitungswasser gewaschen und für je 2 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % Ethanol, dann in Isopropanol und Xylol) gebadet und schließlich unter Verwendung von EuKitt versiegelt.

Tabelle 2-2: Antikörperverdünnungen bei Immunzytochemie und Immunfluoreszenz

Immunzytochemie	
<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
Maus anti-humanes CD14 (monoklonal)	1:50
Maus anti-humanes CD36 (monoklonal)	1:50
Kaninchen anti-humaner vWF (polyklonal)	1:10.000
Kaninchen anti-humanes MyD88 _(C-terminales Peptid) (polyklonal)	1:50
Kaninchen anti-humanes MyD88 _(internes Peptid) (polyklonal)	1:50
Maus anti- <i>Aspergillus niger</i> Glucose-Oxidase (monoklonal)	1:50
Maus anti-humaner TLR1,3,4,5,6,7 (polyklonal)	1:50
Ziege anti-humaner TLR2,5,8 (polyklonal)	1:50
Maus anti-humaner TLR10 (monoklonal)	1:50
Immunfluoreszenz	
<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
Alexa 488 Ziege anti-Kaninchen	1:250
Alexa 488 Huhn anti-Kaninchen	1:250
Alexa 594 Ziege anti-Maus	1:250
Alexa 647 Lectin-HPA Konjugat	1:20
Maus anti-humanes γ -Tubulin (monoklonal)	1:500
Kaninchen anti-humanes MyD88 _(internes Peptid) (polyklonal)	1:500
Kaninchen anti-humanes MyD88 _(C-terminales Peptid) (polyklonal)	1:500

2.2.3 Immunfluoreszenz (IF)

Ähnlich wie bei der ICC entsteht das Signal durch einen Sekundärantikörper, der bei dieser Methode fluoreszenzmarkiert ist.

Die jeweiligen Verdünnungen sind in Tabelle 2-2 angegeben.

Bei den vorbereiteten 8-Well Objektträgern wurde das Medium entfernt und zweimal mit PBS gewaschen. Bei der Zelllinie EA.hy 926, die sich als sensibel gegenüber auch kurzzeitigen Temperaturabfällen erwies, wurde die Temperatur dabei auf 37 °C gehalten. Darauf folgte die Fixierung in 4 % PFA/PBS für 10 min. Nach dem Waschen mit PBST (PBS/0,1 % Triton-X-100) wurden die Präparate 10 min in diesem inkubiert, um die Zellmembran zu permeabilisieren. Anschließend erfolgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen in PBST/5 % BSA für >1 h. Nach erneutem Waschen mit PBST wurde der primäre Antikörper verdünnt in PBST/5 % BSA mit 100 µl/Well für 1 h zugegeben, dann erneut mit PBST gewaschen. Mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper wurde dann für 1 h im Dunkeln inkubiert und anschließend mit PBST gewaschen. Für Doppelfärbungen wurde nacheinander mit beiden primären Antikörpern inkubiert, die sekundären Antikörper wurden gemeinsam zugegeben. Waschschritte und Inkubationszeiten erfolgten dabei analog zur einfachen Fluoreszenzmarkierung. Anschließend wurde eine Kernfärbung über eine 10-minütige Inkubation mit Hoechst 33342 (2 ng/ml PBS) durchgeführt. Nach gründlichem Waschen mit PBS wurden Aufsatz und Maske der Objektträger entfernt und diese in Mowiol/0,1 % DABCO (=1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan, ein Antibleichmittel) eingebettet. Die Lagerung der Präparate erfolgte im Dunkeln bei 4 °C.

2.2.4 Bestimmung der IL-8 Konzentration der Zellkulturüberstände mittels ELISA

Zur Untersuchung der Reaktion der verschiedenen Endothelzellen auf die spezifische Stimulation durch TLR-Liganden bei zytokin-voraktivierten und ruhenden Zellen diente die Bestimmung der IL-8 Sekretion im Zellkulturüberstand nach einer Inkubation von 6 h.

Grundprinzip des verwendeten ELISA-Kits ist ein Sandwich-ELISA, bei dem der das Reaktionsgefäß beschichtende Capture-Antikörper und der später zugegebene Detection-Antikörper das zu untersuchende Antigen - in diesem Fall IL-8 - binden. Ähnlich der ICC bindet das darauf zugegebene Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-

Konjugat an das Biotin des Capture-AK. Die Farbreaktion entsteht schließlich durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin.

Eine 96-Well Platte wurde über Nacht bei 4 °C mit 100 µl Capture-Antikörper pro Well in einer Konzentration von 4 µg/ml PBS beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit dem entsprechenden Waschpuffer, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, erfolgte eine Inkubation mit PBS/BSA/NaN₃ für 1,5 h bei Raumtemperatur um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Auf einen erneuten dreifachen Waschschrift folgte eine zweistündige Inkubation der zu untersuchenden Proben, die in TBS/BSA/Tween (Reagent Diluent) verdünnt wurden. Als Referenz diente ein im Kit enthaltener Standard aus rekombinantem humanen IL-8, der mit dem Reagent Diluent zu einer Standardreihe mit IL-8 Konzentrationen zwischen 30 und 2000 pg/ml verdünnt wurde. Nach dem nächsten Waschschrift wurden je 100 µl des biotinylierten Detection-Antikörpers mit einer Konzentration von 20 ng/ml TBS/BSA/Tween pro Well zugegeben und für 2 h inkubiert. Danach wurden die Wells gewaschen und für 20 min 100 µl des Streptavidin-HRP Konjugats in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung zugefügt, darauf folgte ein weiterer Waschschrift. Für 5 min wurde jetzt die Entwicklerlösung aus je 50 µl H₂O₂ und Tetramethylbenzidin zugegeben, die Farbreaktion wurde - abweichend vom Herstellerprotokoll - schon nach 5 min mit 50 µl 1M H₂SO₄ abgestoppt. Die IL-8 Konzentration der Proben wurde durch den Vergleich mit der IL-8 Standardreihe bestimmt. Die Farbreaktion wurde mit dem Plattenlesegerät bei 450 nm quantifiziert. Um Unregelmäßigkeiten der ELISA-Platte auszugleichen, wurde deren optische Dichte ebenfalls bei 540 nm gemessen und von dem Probenwert subtrahiert.

Tabelle 2-3: Dilution der verschiedenen Zellkulturüberstände für die Untersuchung durch den ELISA

	EA.hy 926	HDMEC	HMEC-1+	HMEC-1o
Keine Aktivierung	1:5	1:20	1:2	1:10
Poly I:C	1:75	∅	1:2	1:2
LPS	1:5	1:30	1:20	1:40
CpG-DNA	1:5	1:20	1:2	1:2
Zytokine	1:200	1:40	1:20	1:40

Zytokine + Poly I:C	1:200	Ø	1:20	1:40
Zytokine + LPS	1:200	1:40	1:20	1:40
Zytokine + CpG-DNA	1:200	1:40	1:20	1:40

2.2.5 Protein-Assay

Zur Normierung des IL-8 ELISAs auf die Proteinmenge wurde eine Proteinbestimmung mittels des BioRAD DC Protein-Assays vorgenommen. Dieser basiert auf einem modifizierten Lowry Assay (114). Dabei wird zunächst in alkalischem Milieu ein Komplex aus Protein und Kupfer(II)Ionen gebildet. Dieser Komplex vermittelt darauf die Reduktion der Folin-Reagenz, was zu einem Farbumschlags von gelb nach blau führt. Diese Farbreaktion kann photometrisch quantifiziert werden.

Zur Durchführung des Assays wurden je 5 µl der Proben von den lysierten Zellen aus dem ELISA (siehe 2.2.1.6 und 2.2.4) auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Als Standard diente eine ebenfalls in RIPA-Puffer gelöste BSA-Reihe von 0,2 mg/ml bis 1,5 mg/ml. Nach Herstellerprotokoll wurde jeder Probe zunächst 25 µl einer alkalischen Kupfertartrat-Lösung (= Reagent A, mit Zusatz von 20 µl Reagent S/ml), dann 200 µl einer die Folin Reagenz enthaltenden Lösung (Reagent B) hinzugefügt. Nach 15 min wurde mit dem Plattenlesegerät die Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen.

2.3 Statistische Auswertung

Bei den Daten handelt es sich um arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen ungepaarten t-Test. Dabei wurden Unterschiede ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 5 % ($p < 0,05$) als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Immunzytochemische Untersuchung der Zelllinie EA.hy 926

Zielsetzung dieser Versuchsserie war neben der Charakterisierung der Zelllinie EA.hy 926 die Auswahl der Antikörper für spätere Untersuchungen durch ELISA und Immunfluoreszenz

Bei der immunzytochemischen Untersuchung der Endothelzelllinie EA.hy 926 wurde die Expression der 10 humanen TLRs sowie der Corezeptoren CD36 (TLR2) und CD14 (TLR4) geprüft. Des Weiteren wurden zwei Antikörper gegen unterschiedliche Epitope von MyD88, nämlich MyD88_(internes Peptid) und MyD88_(C-terminales Peptid) verwendet. Zur Charakterisierung der Endothelzelleigenschaften der EA.hy 926 wurde zusätzlich die Expression des von Willebrandt-Faktors (vWF) geprüft. Als Negativkontrolle diente ein Antikörper gegen die Glucose-Oxidase des Fadenpilzes *Aspergillus niger*. Zur besseren Darstellung in der Lichtmikroskopie wurde zusätzlich eine Färbung mit Hämatoxylin vorgenommen. Die Signalstärken der verschiedenen Antikörperfärbungen sind in Tabelle 3-1 dargestellt.

Tabelle 3-1: Immunzytochemische Untersuchung der Zelllinie EA.hy 926: Quantitative Anfärbung durch die verwendeten Antikörper

Ø = negativ, (+) = schwach positiv, + = positiv, ++ = stark positiv

Antigen	Signalstärke	Antigen	Signalstärke
TLR1	(+)	MyD88 _(internes Peptid)	+
TLR2	+	MyD88 _(C-terminales Peptid)	++
TLR3	+	CD14	Ø
TLR4	++	CD36	+
TLR5	++	vWF	Ø - (+)
TLR6	Ø - (+)		
TLR7	+		
TLR8	++		
TLR9	+		
TLR10	+		

Abgesehen von TLR1 und TLR6, die ein negatives bzw. ein schwach positives Signal zeigten, präsentierten die verschiedenen TLRs ein positives Signal. Der TLR2-Corezeptor CD36 konnte ebenfalls immunzytochemisch markiert werden, wohingegen dem TLR4-Corezeptor CD14 kein positives Signal zuzuordnen war. Ebenfalls ein nur schwaches Signal zeigte vWF.

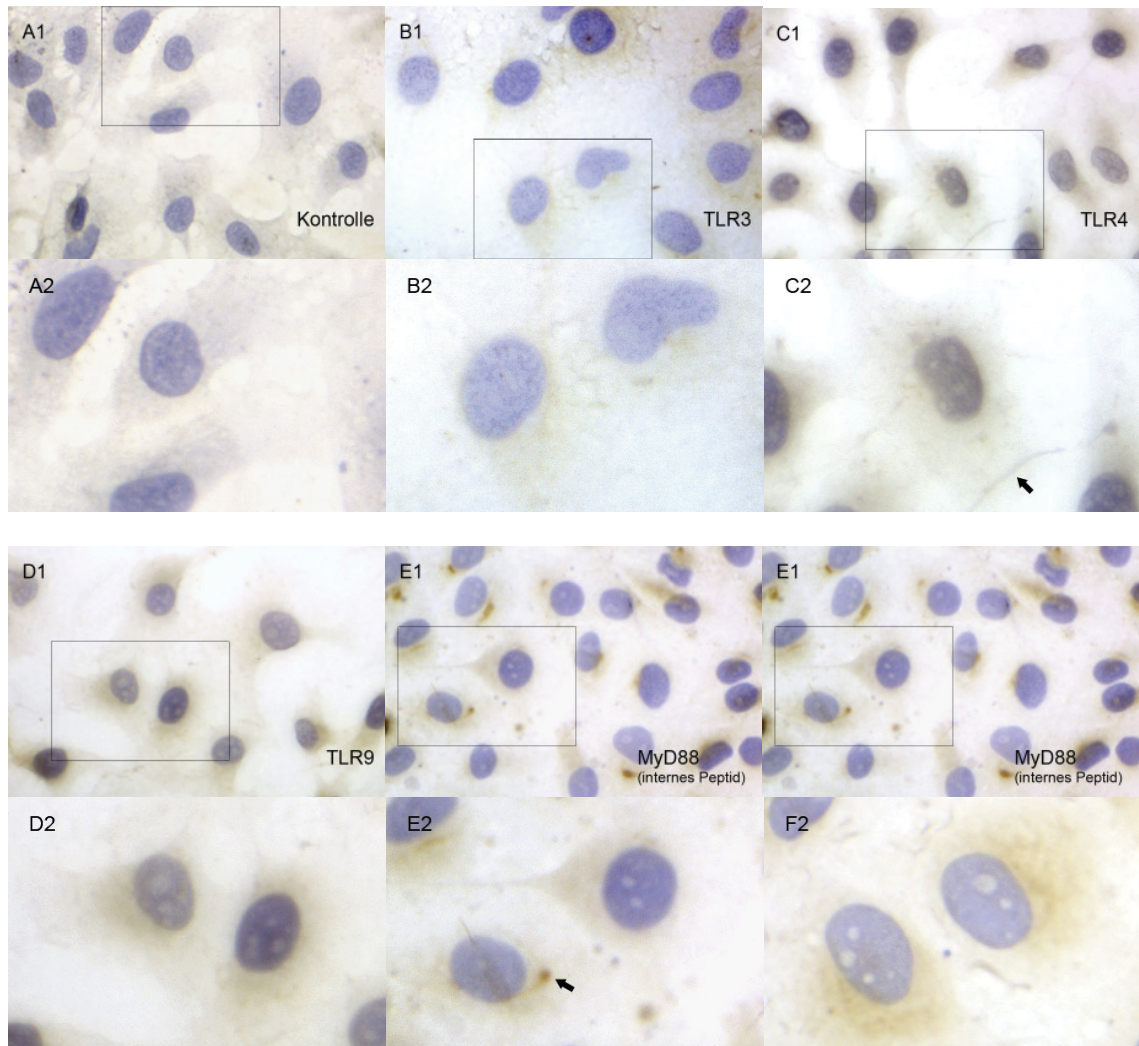


Abbildung 4: Immunzytochemische Färbung der Zelllinie EA.hy 926: Dargestellt sind die Negativkontrolle, TLR3, TLR4, TLR9 und die beiden MyD88-Antikörper.

Alle Präparate wurden zusätzlich mit Hämatoxylin gefärbt. Positive Antikörperfärbungen zeichnen sich durch ein bräunliches Signal aus. Reihe 1 zeigt eine Übersicht bei ca. 30-facher Vergrößerung, Reihe 2 einen vergrößerten Ausschnitt der in 1 markierten Strukturen bei ca. 60-facher Vergrößerung.

TLR3, TLR4 und TLR9 und MyD88 zeigen ein positives Signal. Bei der Ausschnittsvergrößerung für TLR4 (C2) ist die Zellmembran betont (Pfeil). Die beiden Antikörper gegen MyD88 weisen deutliche Unterschiede auf. Während die MyD88_(C-terminales Peptid) Zellen perinukleär betont, aber diffus anfärbt, konzentriert sich das Signal von MyD88_(internes Peptid) in punkt- oder kommaförmigen Strukturen (Pfeil).

Mit Hinblick auf die geplante Immunfluoreszenz wurden nun zwei TLRs ausgesucht, die in unterschiedlichen Zellkompartimenten, d.h. auf der Zellmembran oder endosomal, exprimiert werden und gleichzeitig ein positives Signal in der immunzytochemischen Antikörperfärbung präsentiert haben. Für diese weiteren Versuche wurden der intrazellulär exprimierte TLR9 sowie der membranständige TLR4 ausgewählt (Färbemuster dargestellt in Abbildung 4).

Die beiden Antikörper gegen das TLR-Adaptermolekül MyD88 (MyD88_(C-terminales Peptid) und MyD88_(internes Peptid)) zeigten bei lichtmikroskopischer Betrachtung ebenfalls ein deutlich positives Signal. Dabei führte der Antikörper gegen das C-terminale Peptid von MyD88 zu einer diffusen Anfärbung des Zellkörpers mit Betonung des perinukleären Bereichs. Der zweite Antikörper gegen MyD88, MyD88_(internes Peptid), präsentierte neben einer schwächer ausgeprägten Markierung der gesamten Zelle fokale Signalanreicherungen, die ein punkt- oder kommaförmiges Muster bildeten und eher in der Peripherie des Zellkerns lokalisiert sind (Abbildung 4).

3.2 Modulation der IL-8 Sekretion durch TLR-spezifische und unspezifische Aktivierung bei verschiedenen Endothelien

Die Reaktionsvariabilität verschiedener Endothelzellen bei Stimulierung mit proinflammatorischen Zytokinen sowie ausgewählten TLR-Liganden sollte durch die Bestimmung der IL-8 Konzentration im Zellkulturüberstand untersucht werden. Dafür wurde bei ruhenden oder durch proinflammatorische Zytokine voraktivierten Zellen (TNF- α , IFN- γ und IL1- β , jeweils $c = 1000$ U/ml für 24 h) die IL-8 Sekretion nach einer 6-stündigen Inkubation mit den TLR-Liganden Poly I:C ($c = 50$ ng/ml), LPS ($c = 100$ ng/ml) und CpG-DNA ($c = 1$ μ M) durch einen Sandwich-ELISA bestimmt. Mit diesem Versuchsaufbau wurden die Endothelzellen EA.hy 926, HDMEC und HMEC-1 untersucht.

Bei der Untersuchung der Zelllinie aus Nabelschnurendothel, EA.hy 926, bewirkte die Inkubation mit Poly I:C bei den nicht-voraktivierten Zellen die deutlichste Beeinflussung der IL-8 Sekretion mit einer 23-fachen Steigerung im Vergleich zu der Kontrolle mit in reinem Medium inkubierten Zellen. Auch die Aktivierung der Zellen durch LPS führte zu einer signifikanten Steigerung, die aber geringer ausfiel (ca. 1,25-fach), wohingegen CpG-DNA keine signifikante Änderung bewirkte.

Die Zytokinbehandlung führte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu einer signifikanten Steigerung der IL-8 Sekretion um das 33-fache. Die Behandlung mit proinflammatorischen Zytokinen und den spezifischen TLR-Liganden führte bei der Inkubation mit Zytokinen und CpG-DNA oder LPS zu einer leichten, bei der Behandlung mit Zytokinen und Poly I:C zu einer deutlicheren Steigerung der

ermittelten IL-8 Konzentration im Zellkulturüberstand im Vergleich zu den nur durch Zytokine behandelten Zellen (siehe Abbildung 5).

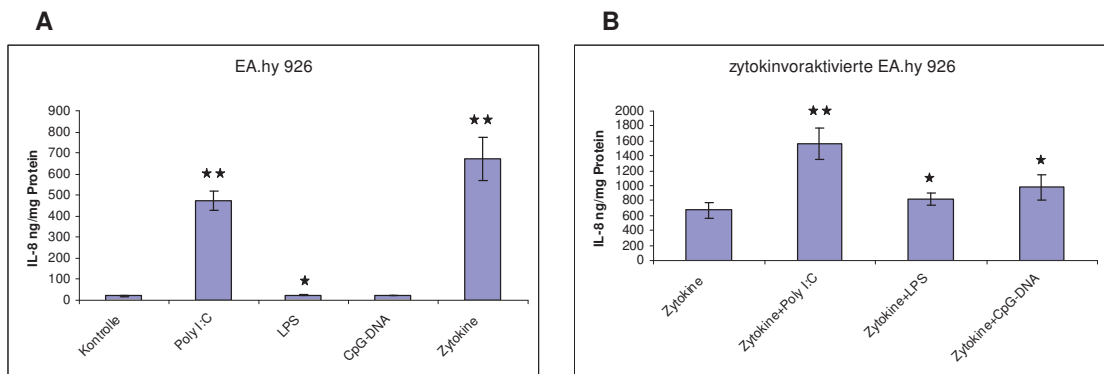


Abbildung 5: Endothelzellen der Zelllinie EA.hy 926 reagieren auf eine spezifische Stimulation mit den TLR-Liganden Poly I:C und auf LPS sowie auf die unspezifische Stimulation mit Zytokinen mit einer Steigerung der IL-8 Sekretion

Ruhende Zellen der Endothelzelllinie EA.Hy 926 zeigen eine signifikante Steigerung der IL-8 Sekretion nach Inkubation mit den TLR-Liganden Poly I:C und zu deutlich geringerem Maße LPS sowie bei unspezifischer Stimulation durch Zytokine. Bei Zytokinverhandlung ist eine weitere signifikante Steigerung durch zusätzliche Inkubation mit Poly I:C, LPS und auch CpG-DNA zu beobachten

Die Graphiken zeigen die IL-8 Konzentration im Zellkulturüberstand bezogen auf die Zellproteinmenge bei der Zelllinie EA.hy 926 nach 6-stündiger Inkubation mit spezifischen Liganden für TLR3 (Poly I:C, c = 50 µg/ml), TLR4 (LPS, c = 100 ng/ml) und TLR9 (CpG-DNA, c = 1 µM). Zytokinvoraktivierung mit TNF-α, IFN-γ und IL1-β (jeweils c = 1000 U/ml) für 24 h (A): Mediumkontrolle im Vergleich zu spezifischer TLR-Aktivierung oder Zytokinaktivierung (B): reine Zytokinaktivierung im Vergleich zu Zytokinaktivierung und zusätzlicher Inkubation mit verschiedenen TLR-Liganden

[n = 3]

★ = p < 0,05 ★★ = p < 0,001

Bei den primären Endothelzellen HDMEC (Abbildung 6) wurde die IL-8 Sekretion nach Inkubation mit LPS und CpG-DNA bei ruhenden und voraktivierten Zellen getestet. Dabei zeigte sich eine deutliche Steigerung der IL-8 Sekretion durch LPS-Stimulierung um den Faktor 9 des Kontrollwertes der Zellen ohne Liganden- oder Zytokininkubation. Bei der Aktivierung durch CpG-DNA konnte hingegen ein signifikanter Rückgang um die Hälfte des Kontrollwertes beobachtet werden. Die Voraktivierung durch proinflammatorische Zytokine steigerte die IL-8 Sekretion der Zellen ohne TLR-Ligandenaktivierung auf das 8-fache. Die Behandlung mit Zytokinen und CpG-DNA führte zu keiner weiteren signifikanten Änderung, während die Inkubation mit Zytokinen und LPS die IL-8 Werte gegenüber den nur zytokinaktivierten Zellen etwa verdoppelte.

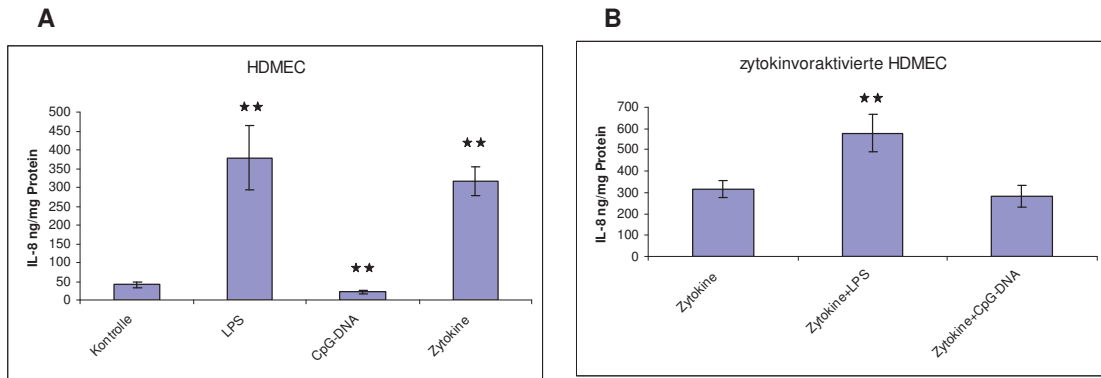


Abbildung 6: Primäre Endothelzellen (HDMEC) reagieren auf eine spezifische Stimulierung durch TLR-Liganden mit einer Steigerung oder Reduktion der IL-8 Sekretion

Ruhende HDMEC reagieren auf die Inkubation mit LPS mit einer Steigerung, auf eine Inkubation mit CpG-DNA mit einer Erniedrigung der IL-8 Sekretion. Bei zytokinvoraktivierten Zellen ist nur durch zusätzliche Inkubation mit LPS eine zusätzliche signifikante Änderung herbeizuführen.

Dargestellt ist die IL-8 Konzentration im Zellkulturüberstand bezogen auf die Zellproteinmenge bei den primären HDMEC nach 6-stündiger Inkubation mit spezifischen Liganden für TLR4 (LPS, c = 100 ng/ml) und TLR9 (CpG-DNA, c = 1 µM), auf Inkubation mit Poly I:C wurde wegen fehlendem Zellmaterial verzichtet. Zytokinvoraktivierung mit TNF-α, IFN-γ und IL1-β (jeweils c = 1000 U/ml) für 24 h

(A): Mediumkontrolle im Vergleich zu spezifischer TLR-Aktivierung oder Zytokinaktivierung

(B): reine Zytokinvoraktivierung im Vergleich zu Zytokinvoraktivierung und zusätzlicher Inkubation mit den TLR-Liganden LPS und CpG-DNA

[n = 3]

★★ = p<0,001

Bei den HMEC-1 handelt es sich um eine Zelllinie, die sich von primären dermalen Endothelzellen ableitet. Um zu prüfen, ob die Kultivierung mit EGF und Hydrocortison die immunogenen Eigenschaften der Zellen beeinflusst, wurden zum Vergleich ebenfalls HMEC-1 untersucht, die ohne diese Zusätze kultiviert worden waren.

In Abbildung 7 stellt A/B die mit dem Wachstumsfaktor EGF und Hydrocortison kultivierten HMEC-1 dar (HMEC-1+); B/C zeigt die IL-8 Sekretion bei HMEC-1, die ohne diese Zusätze kultiviert wurden (HMEC-1o). Dabei zeigte es sich, dass durch das jeweilige Inkubationsmedium vor allem die quantitative IL-8 Sekretion beeinflusst wurde. Bei den HMEC-1o war im Vergleich zu den HMEC-1+ eine gesteigerte IL-8 Sekretion um den Faktor 2-3 zu beobachten, allerdings zeigten die von den verschiedenen Liganden induzierten IL-8 Sekretionen in ihrem Verhältnis zueinander keine auffälligen Unterschiede zwischen den HMEC-1+ und den HMEC-1o.

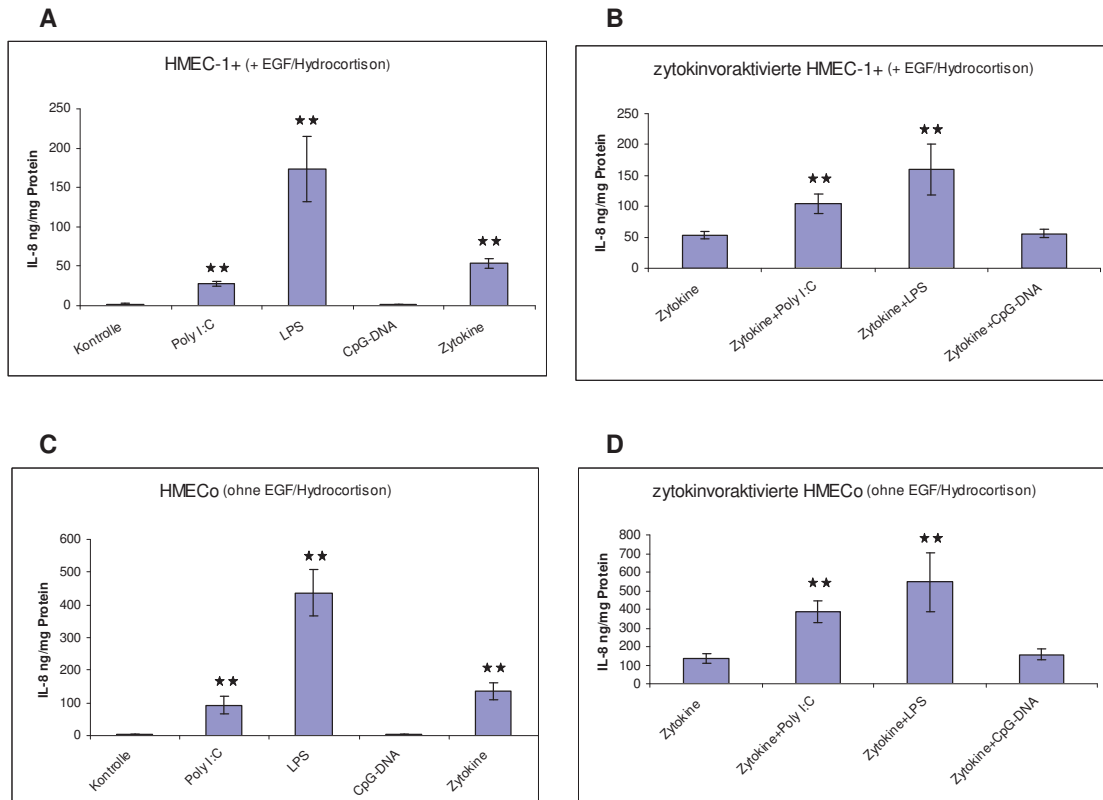


Abbildung 7: Die Zelllinie HMEC-1 reagiert auf die Stimulierung mit den TLR-spezifischen Liganden Poly I:C und LPS mit einer Steigerung der IL-8 Sekretion

Ruhende sowie zytokinvoraktivierte HMEC-1 steigern ihre IL-8 Sekretion signifikant nach Inkubation mit Poly I:C und LPS. Die Inkubation mit CpG-DNA kann keinen signifikanten Effekt auslösen. Bei unterschiedlichen Kulturbedingungen verändert sich die quantitative Antwort der IL-8 Sekretion, die relative Steigerung der IL-8 Sekretion der einzelnen Liganden bleibt unbeeinflusst.

Dargestellt ist die IL-8 Konzentration in Zellkulturüberstand bei der Linie HMEC-1 bezogen auf die Zellproteinmenge bei Zellen der Linie HMEC-1 nach 6-stündiger Inkubation mit spezifischen Liganden für TLR3 (Poly I:C, c = 50 µg/ml), TLR4 (LPS, c = 100 ng/ml) und TLR9 (CpG-DNA, c = 1 µM). Zytokinvoraktivierung mit TNF-α, IFN-γ und IL1-β (jeweils c = 1000 U/ml) für 24 h. Die HMEC-1 in A/B wurden im Gegensatz zu den Zellen aus C/D mit EGF und Hydrocortison kultiviert.

(A)/(C): Mediumkontrolle im Vergleich zu spezifischer TLR-Aktivierung oder Zytokinaktivierung
 (B)/(D): reine Zytokinvoraktivierung im Vergleich zu Zytokinvoraktivierung und zusätzlicher Inkubation mit verschiedenen TLR-Liganden

[n = 3]

★★ = p < 0,001

Die Stimulierung der HMEC-1 mit CpG-DNA in der hier gewählten Konzentration (c = 1 µM) führte zu keiner signifikanten Änderung der IL-8 Sekretion gegenüber der Kontrolle, wobei Poly I:C die Werte um den Faktor 13-19 und LPS um den Faktor 84-90 gegenüber der Inkubation in reinem Medium ansteigen ließen. Die Zytokinaktivierung führte zu einer signifikanten Steigerung der IL-8 Konzentration um den Faktor 27. Unter den voraktivierten Zellen kam es nach Inkubation mit Zytokinen und CpG-DNA zu keiner signifikanten Änderung, die Stimulierung mit Zytokinen und

Poly I:C steigerte die IL-8 Sekretion weiter um den Faktor 2-3, LPS um den Faktor 3-4 im Vergleich zu den voraktivierten Zellen ohne zusätzliche Inkubation mit einem TLR-Liganden. Vergleicht man die IL-8 Sekretion der HMEC-1 nach LPS Inkubation bei zytokinaktivierten und nichtaktivierten Zellen, so lässt sich im Gegensatz zu EA.hy 926 und HDMEC kein signifikanter Unterschied erkennen. Die Voraktivierung führte zu keiner signifikanten weiteren Steigerung bei anschließender Stimulierung mit LPS.

Somit zeigten sich in der IL-8 Sekretion als Reaktion auf spezifische TLR-Liganden bei den einzelnen Endothelzellen unterschiedliche Reaktionen. So war die bei den HDMEC durch CpG-DNA hervorgerufene Minderung der IL-8 Sekretion bei den weiteren untersuchten Zellen nicht nachweisbar. Bei deutlichen Steigerungen der IL-8 Sekretion nach LPS Inkubation der HDMEC und HMEC-1 um das 9- bzw. 84-90-fache im Vergleich zur Kontrolle zeigten die EA.hy 926 nur eine minimale wenn auch signifikante Steigerung auf das 1,25-fache. Eine Übersicht gibt die Tabelle 3-2.

Tabelle 3-2: Vergleich der verschiedenen untersuchten Endothelzellen in ihrer Reaktion auf spezifische TLR-Liganden gemessen an der induzierten IL-8 Sekretion

ruhende Zellen	Poly I:C	LPS	CpG-DNA
Ea.hy 926	↑↑	↑	↔
HDMEC	∅	↑↑	↓↓
HMEC-1	↑↑	↑↑	↔

voraktivierte Zellen	Poly I:C	LPS	CpG-DNA
Ea.hy 926	↑↑	↑	↑
HDMEC	∅	↑↑	↔
HMEC-1	↑↑	↑↑	↔

Gemessen wurde die IL-8 Sekretion nach 6-stündiger Inkubation mit spezifischen Liganden für TLR3 (Poly I:C), TLR4 (LPS) und TLR9 (CpG-DNA) bei ruhenden und durch Zytokine (TNF- α , IFN- γ und IL1- β) voraktivierten Zellen.

- ↑ = signifikante Steigerung der IL-8 Sekretion (p<0,05)
- ↑↑ = signifikante Steigerung der IL-8 Sekretion (p<0,001)
- ↓↓ = signifikante Minderung der IL-8 Sekretion (p<0,001)
- ↔ = keine signifikante Änderung der IL-8 Sekretion
- ∅ = nicht untersucht

3.3 Translokation von MyD88 durch spezifische TLR-Stimulierung

Die Rekrutierung des endogen exprimierten Adapterproteins MyD88 an den jeweiligen TLR-Rezeptor als ein initialer Schritt der Signalfortleitung sollte nun durch indirekte Immunfluoreszenz dargestellt werden. Mit Blick auf die Reaktivität der verschiedenen Endothelzellen im IL-8 ELISA wurden dafür bei ruhenden Zellen der Zelllinie HMEC-1 zunächst die beiden Antikörper MyD88_(internes Peptid) und MyD88_(C-terminales Peptid) getestet, die bereits bei der Immunzytochemie zum Einsatz kamen (Abbildung 8).

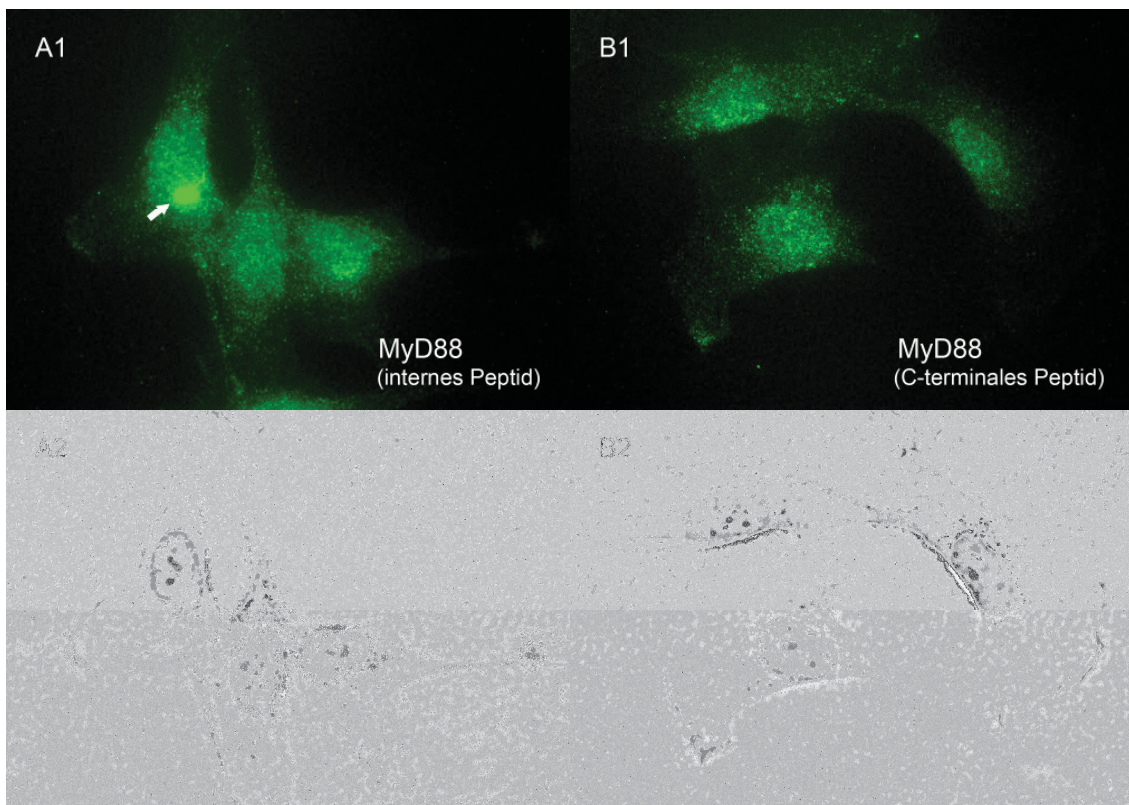


Abbildung 8: Fluoreszenzfärbung bei der Zelllinie HMEC-1 mit den beiden Antikörpern gegen verschiedene Epitope von MyD88

(A) MyD88_(internes Peptid), (B) MyD88_(C-terminales Peptid), beide zeigen ein feines körniges Fluoreszenzsignal. Bei MyD88_(internes Peptid) (A) sind zusätzlich bei einem Teil der Zellen fokale Signalanhebungen (Pfeil) zu beobachten. (Vergrößerung ca. 65x)

Beide Antikörper bewirken eine feingranuläre Anfärbung, die sich über den ganzen Zellkörper verteilt, perinukleär aber verdichtet ist. Außerdem zeigt sich isoliert bei dem Antikörper MyD88_(internes Peptid) die bereits bei der Immunzytochemie aufgetretene starke fokale Signalanreicherung (vergleiche Abbildung 4, Kapitel 3.1). Für die weiteren Versuche zur Translokation von MyD88 wurde deshalb der Antikörper MyD88_(internes Peptid) ausgewählt.

Um die Translokation von MyD88 darzustellen, wurden die Endothelzelllinie HMEC-1 vor der Färbung durch Immunfluoreszenz durch die Inkubation mit Liganden von TLRs, die aus verschiedenen subzellulären Kompartimenten signalisieren, aktiviert. Verwendet wurden LPS ($c = 100 \text{ ng/ml}$) für TLR4 und CpG-DNA ($c = 1 \text{ }\mu\text{M}$) für TLR9. Als Kontrolle fungierten der TLR3-Ligand Poly I:C ($c = 50 \text{ }\mu\text{g/ml}$), der, da er nicht über MyD88 transduziert wird, keine Umverteilung bewirken sollte und zusätzlich Zellen, die in reinem Medium inkubiert wurden. Untersucht wurden die Veränderungen nach einer Inkubation von 5 min, 10 min und - um ein deutlich längeres Zeitfenster zu kontrollieren - von 4 h.

Dabei zeigen die Mediumkontrolle (Abbildung 9) und Poly I:C (Abbildung 10) die feingranuläre Musterung, die bereits bei der konventionellen Mikroskopie zu sehen war. Dieses körnige Signal ist meist im Kernbereich vermehrt, es lässt sich dort aber keine Vergrößerung der Granulierung im Vergleich zur Peripherie feststellen. Je nach Struktur der einzelnen Zelle bleibt die Granulierung bis zur Membran homogen oder verdünnt sich innerhalb der Zellausläufer. Die Randbereiche sind teilweise moderat betont

Bei den LPS stimulierten Zellen zeigt sich im Zellkörper eine ähnlich feinkörnige Fluoreszenzmusterung, die sich nach 10-minütiger Inkubation mit LPS (Abbildung 11: B1) zwar etwas homogener verteilt als bei den Kontrollen darstellt, aber noch zu wenig eindeutig ist, um sie auf die Aktivierung zurückzuführen. Dahingegen stellen sich granuläre Signalanhebungen (Pfeilmarkierung) im Randbereich dar, die sich sowohl nach der 5-minütigen als auch nach der 10-minütigen Inkubation mit LPS zeigen (Abbildung 11: A1, B1). Den deutlichsten Unterschied kann man dabei auf den Aufnahmen nach 10-minütiger Inkubation ausmachen. Vergleicht man dieses Bildpaar mit dem entsprechenden nach 10-minütiger Inkubation mit Poly I:C, so stellen sich in den jeweiligen Phasenkontrast-Aufnahmen die Zellmembranen ähnlich gut dar, im Fluoreszenzbild jedoch bildet sich die Zellmembran der mit LPS behandelten Zelle deutlich besser ab. Bei der Aktivierung für 4 h kann für LPS hingegen keine Veränderung des Signalmusters im Vergleich zu den Kontrollen ausgemacht werden.

Auch die mit CpG-DNA stimulierten Zellen zeigen ein verändertes Färbungsmuster. Dabei kommt es zu einer perinukleären Betonung des Signals. Charakteristisch ist dabei die im Vergleich zur Mediumkontrolle grobscholligere Granulierung in Kernbereich, die sich hier in den Bildern der 10-minütigen und besonders der 5-minütigen Aktivierung darstellt. In der 4-stündigen Aktivierung ist diese Vergrößerung des perinukleären Signals nicht mehr zu erkennen. Im Vergleich zur Kontrolle ist das Signal

aber mehr in den perinukleären Bereich konzentriert. Bei den signalreichen Foki war insgesamt keine Beeinflussung durch die Aktivierung festzustellen.

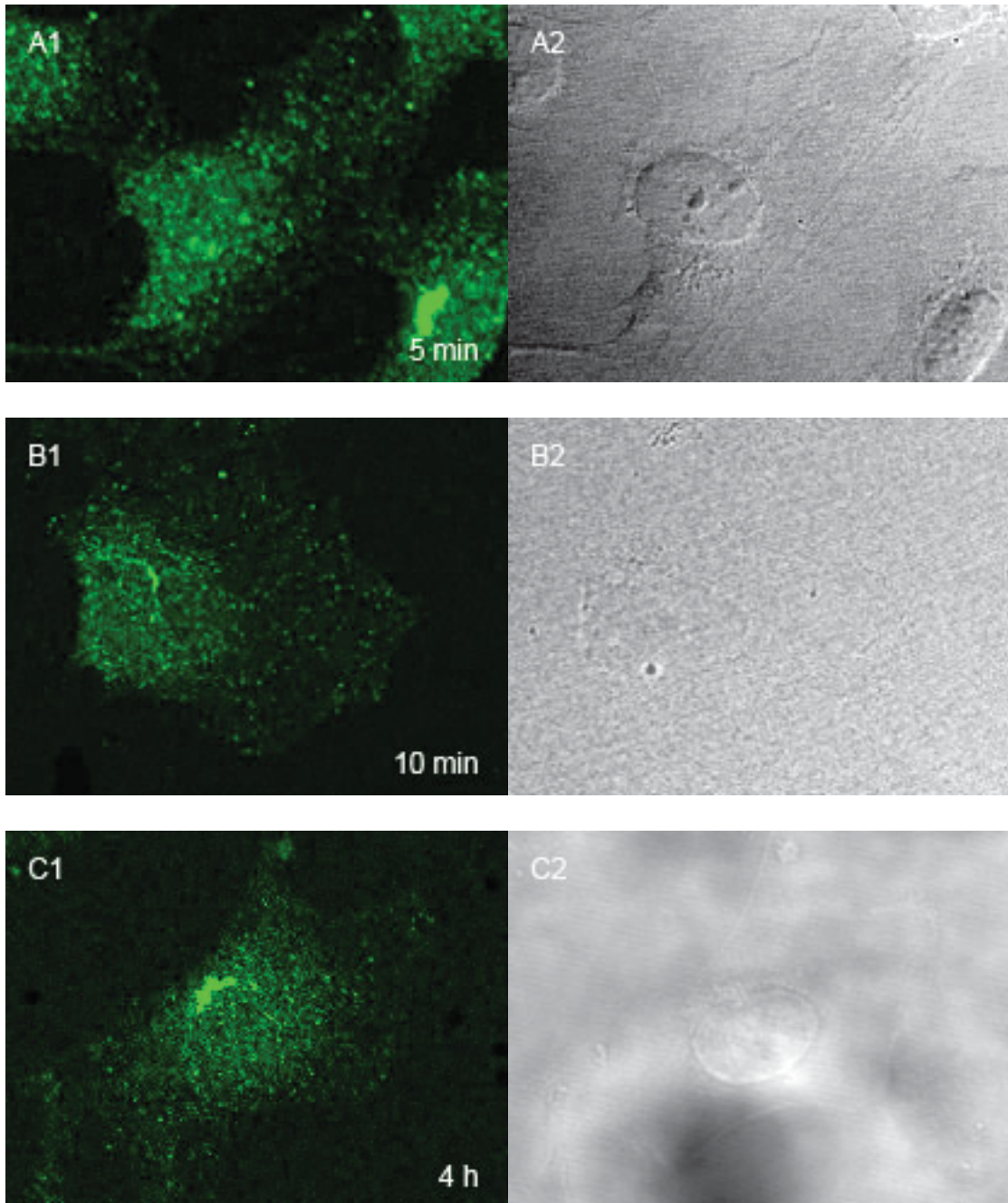


Abbildung 9 : Darstellung von MyD88 nach Inkubation in reinem Medium (Mediumkontrolle)

Die Zellen zeigen ein feingranuläres, um den Zellkern herum verdichtetes Signal, ein Teil der Zellen weist signalreiche Foki auf.

Die Zellen wurden 5 min, 10 min oder 4 h nach Inkubation in reinem Medium fixiert. Anschließend folgte die Immunfluoreszenzfärbung mit dem Antikörper MyD88_(internes Peptid). (Vergrößerung ca. 120x)

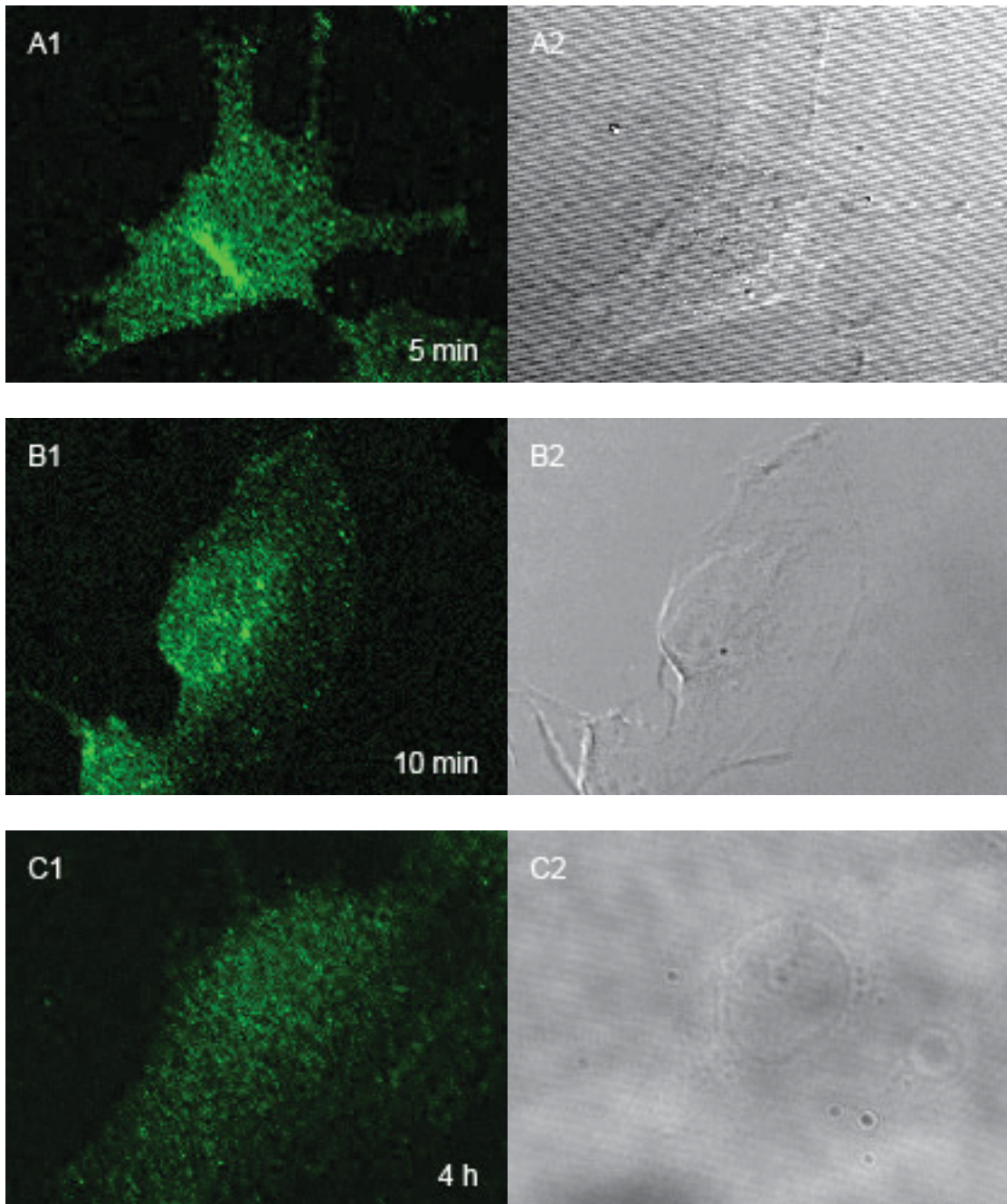


Abbildung 10: Nach Inkubation mit Poly I:C zeigt sich keine Änderung des Verteilungsmusters von MyD88 im Vergleich zur Mediumkontrolle

Wie bei der Mediumkontrolle zeigt sich ein feingranuläres Muster, das über den ganzen Zellkörper verteilt und perinukleär leicht verdichtet ist. Zwischen den verschiedenen Inkubationszeiten gibt es keine maßgebliche Änderung des Verteilungsmusters.

Die Zellen wurden für 5 min, 10 min oder 4 h mit Poly I:C (c = 50 µg/ml) inkubiert und sofort fixiert. Anschließend folgte die Immunfluoreszenzfärbung mit dem Antikörper MyD88_(internes Peptid). (Vergrößerung ca. 120x)

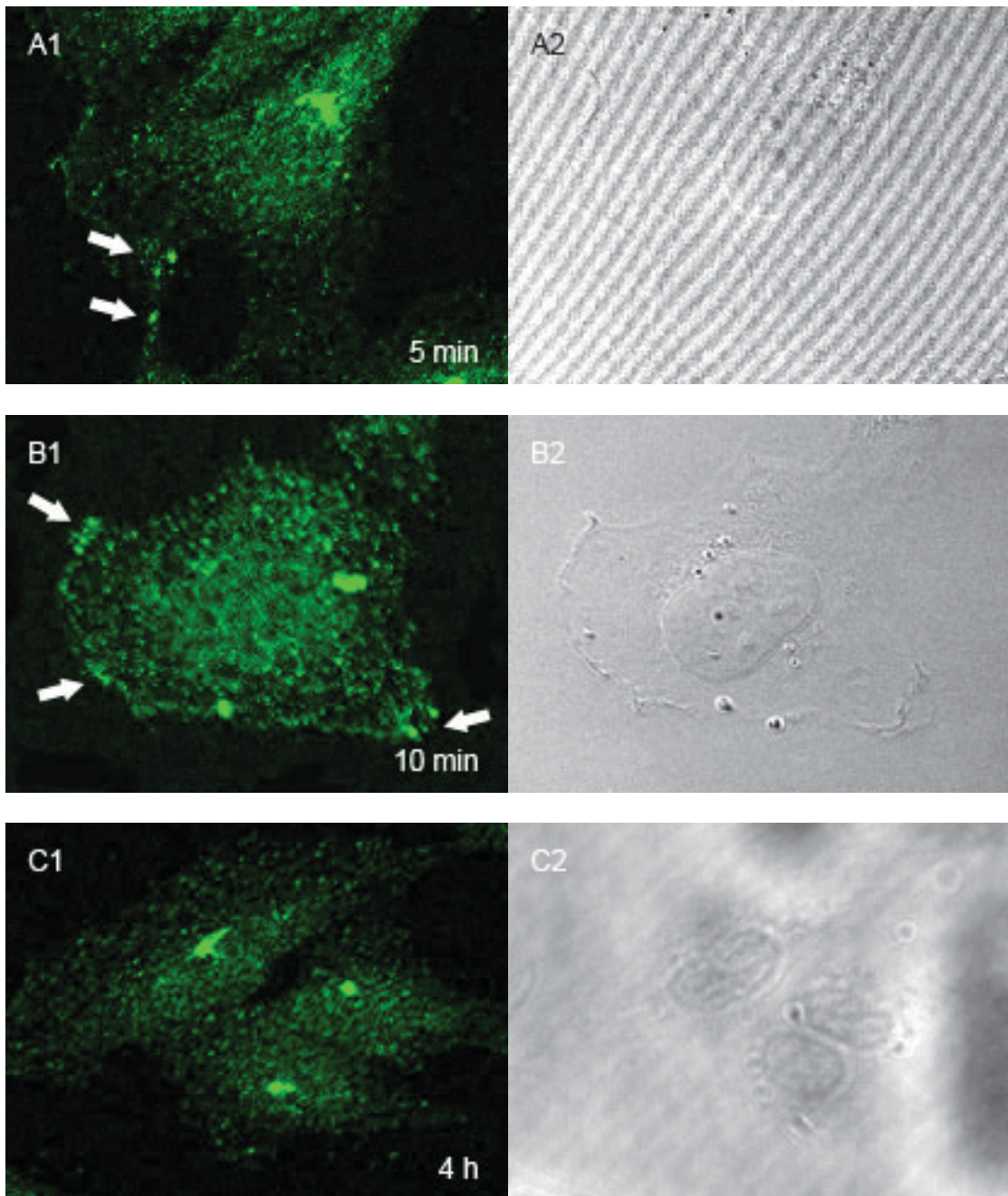


Abbildung 11: Nach Inkubation mit LPS wird MyD88 zur Zellmembran rekrutiert

Bei den Bildern der Inkubation für 5 min und deutlicher bei 10 min zeigen sich granuläre Signalanhebungen im Membranbereich (Pfeil), die sich bei der Mediumkontrolle und bei Poly I:C Inkubation nicht darstellen. Die bereits bei ruhenden Zellen beobachteten signalreichen Foki zeigen keine Beeinflussung durch die LPS-Aktivierung.

Die Zellen wurden für 5 min, 10 min oder 4 h mit LPS ($c = 100 \text{ ng/ml}$) inkubiert und sofort fixiert. Anschließend folgte die Immunfluoreszenzfärbung mit dem Antikörper MyD88_(internes Peptid).
(A + B: Vergrößerung ca. 120x, C: 80x)

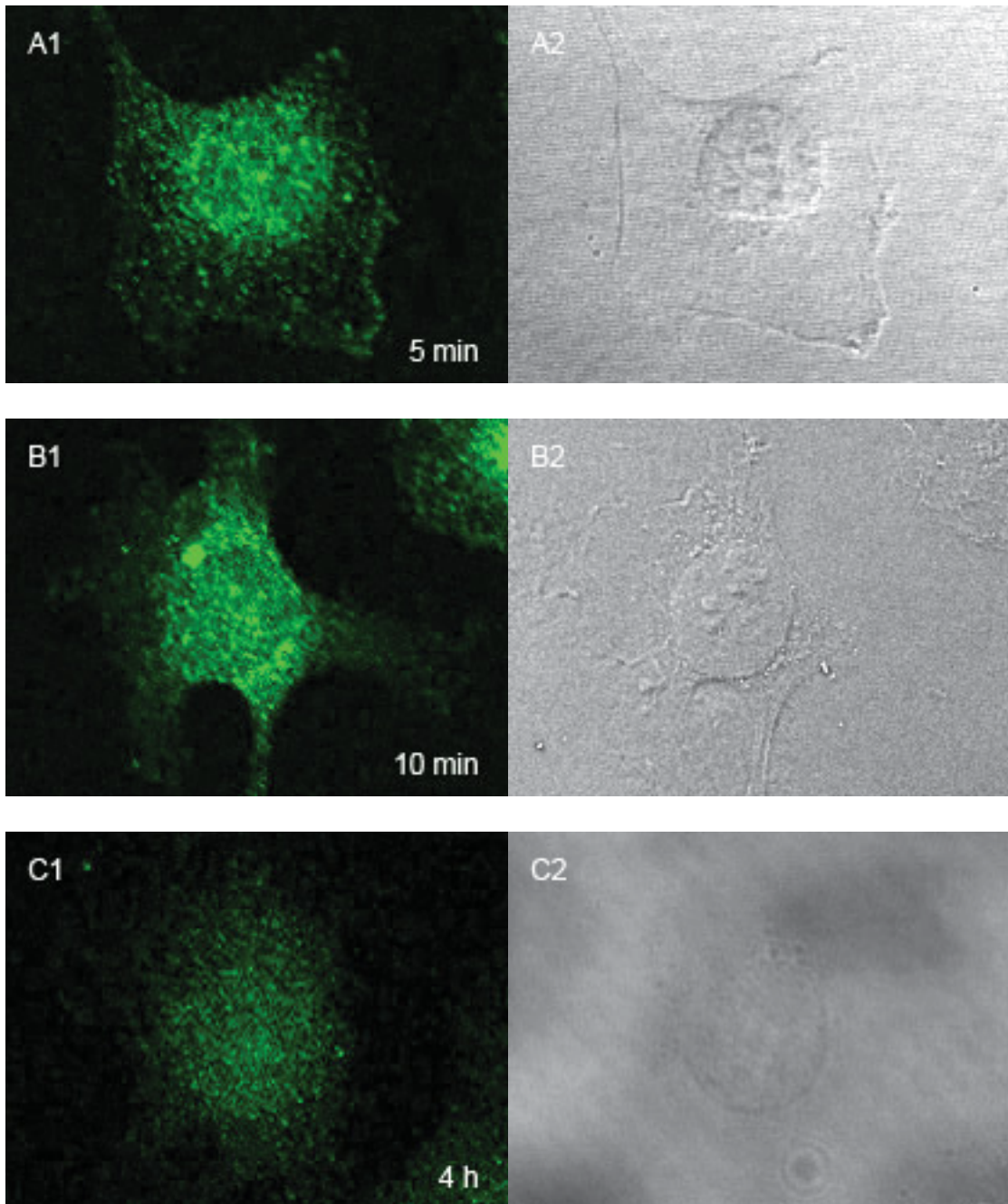


Abbildung 12: Nach Inkubation mit CpG-DNA wird MyD88 in Richtung Zellkern umverteilt

Auch hier zeigen die Inkubationen für 5 min und 10 min ein verändertes Darstellungsmuster mit einem gröber granulierten Fluoreszenzsignal vor allem perinukleär. Die bereits bei ruhenden Zellen beobachteten signalreichen Foki zeigen keine Beeinflussung durch die CpG-DNA-Aktivierung.

Die Zellen wurden für 5 min, 10 min oder 4 h mit CpG-DNA ($c = 1 \mu\text{M}$) inkubiert und sofort fixiert. Anschließend folgte die Immunfluoreszenzfärbung mit dem Antikörper MyD88_(internes Peptid). (Vergrößerung ca. 120x)

Zusammenfassend zeigte sich also innerhalb einer Inkubationszeit von 5-10 Minuten eine Umverteilung von MyD88 zur Zellmembran nach Inkubation mit LPS oder in den perinukleären Bereich mit Vergrößerung der Granulierung nach Inkubation mit CpG-DNA beobachten. Bei der Inkubation mit Poly I:C, welches nicht über MyD88 transduziert wird, ergibt sich ein Bild wie bei der Kontrolle mit in reinem Medium inkubierten ruhenden Zellen. Bezüglich der signalreichen Foki des MyD88_(internes Peptid)-Antikörpers war keine Beeinflussung durch die Aktivierung mit den spezifischen TLR-Liganden festzustellen. Abbildung 13 zeigt eine Darstellung der verschiedenen Translokationsmuster nach 10-minütiger Inkubation mit dem jeweiligen Liganden.

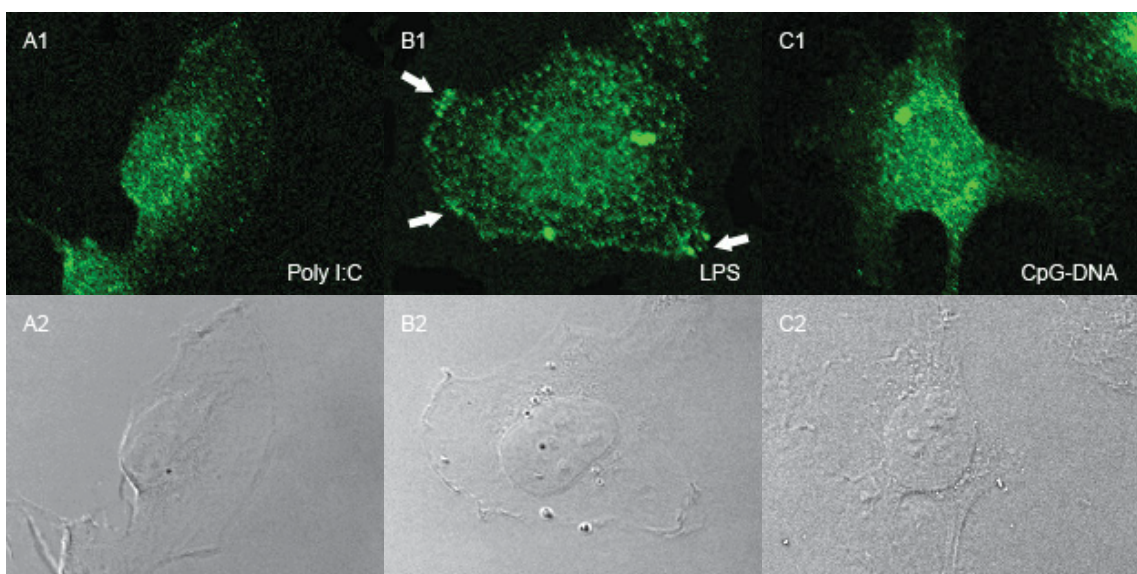


Abbildung 13: Übersicht über die Translokation von MyD88 nach 10-minütiger Inkubation mit den TLR-Liganden Poly I:C, LPS und CpG-DNA

Im Vergleich zu Poly I:C, welches nicht über MyD88 transduziert wird, zeigt sich nach der Inkubation mit dem Liganden LPS (TLR4) eine vermehrte Markierung der Plasmamembran, wohingegen nach einer Inkubation mit CpG-DNA (TLR9) eine Umverteilung in den perinukleären Bereich sowie eine Vergrößerung der Granulierung zu beobachten ist. In dem hier dargestellten Zeitraum von 10 min war dies am deutlichsten zu beobachten. Die Zellen wurden für 10 min mit Poly I:C (c = 50 µg/ml), mit LPS (c = 100 ng/ml) und mit CpG-DNA (c = 1 µM) inkubiert und sofort fixiert. Anschließend folgte die Immunfluoreszenzfärbung mit dem Antikörper MyD88_(internes Peptid). (Vergrößerung ca. 80x)

3.4 Untersuchung des Färbungsmusters des Antikörpers MyD88_(internes Peptid)

Schließlich sollte die Struktur, die sich nur mit dem MyD88-Antikörper gegen das interne Peptid anfärben ließ, eingehender untersucht werden. Diese sowohl bei der Immunzytochemie als auch bei der Immunfluoreszenz auftretende lokale Anreicherung ließ sich allen drei verschiedenen untersuchten Endothelien EA.hy 926, HDMEC und HMEC-1 darstellen (Abbildung 14).

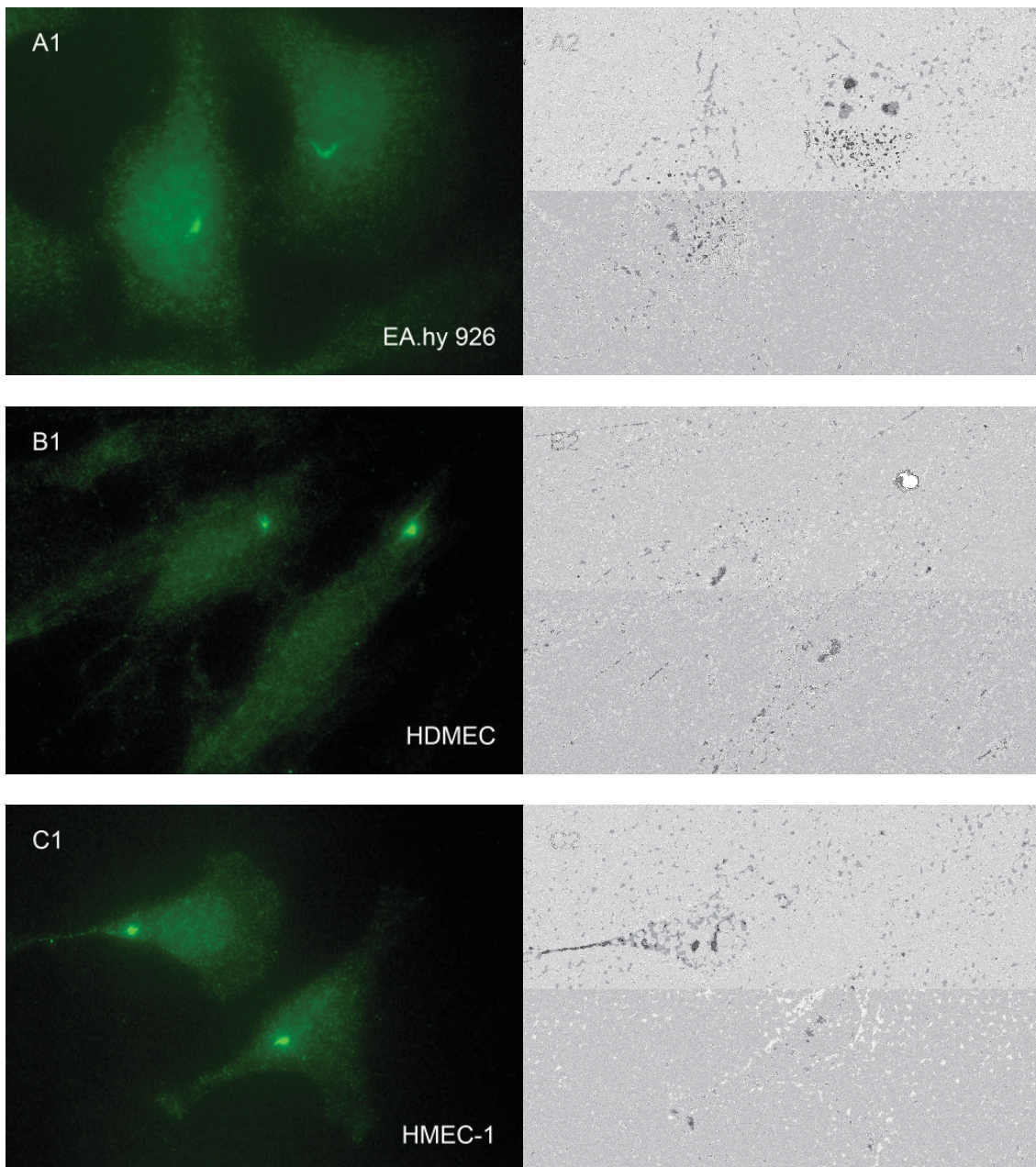


Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung mit dem Antikörper MyD88_(internes Peptid) bei den in dieser Arbeit untersuchten Endothelzellarten EA.hy 926, HDMEC und HMEC-1

Alle Zellarten zeigen eine fokale Signalanhebung. (Vergrößerung ca. 70x)

Bei den Versuchen aus 3.3 zeigte sich nach Aktivierung keine Veränderung der Form oder Häufigkeit des Signals. Dieses stellte sich in den meisten Fällen punktförmig dar, zeigte sich aber auch häufiger komma- oder halbkreisförmig und lag in der Umgebung des Zellkerns. Abbildung 15 zeigt eine Übersicht der verschiedenen Darstellungsmuster. Diese Variabilität des Signalmusters wurde bei allen untersuchten Endothelzellen beobachtet.

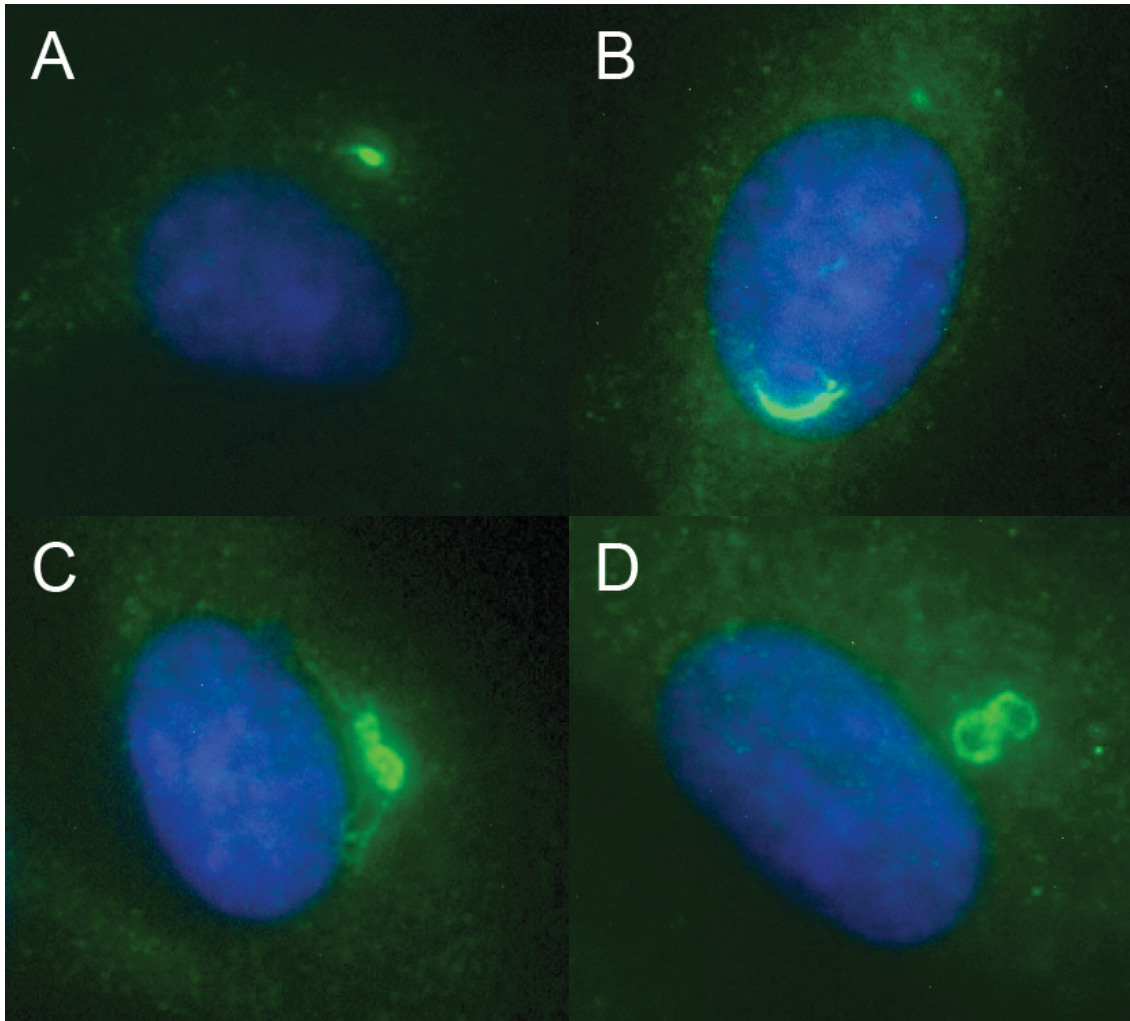


Abbildung 15: Darstellung der variablen fokalen Signalanhebungen durch den Antikörper MyD88_(internes Peptid) (grünes Signal). Kernfärbung durch Hoechst 33342 (blaues Signal)

A zeigt die häufigste Darstellung als punktförmiges Signal mit angedeuteten gebogenen Ausläufern. (Vergrößerung ca. 250x)

Verwendete Zellen: A-C: HMEC-1, D: EA.hy 926

Mit Hinblick auf das meist punktförmige Signal und die Nähe zum Zellkern wurde eine zusätzliche Färbung des Golgi-Apparats vorgenommen. Abbildung 16 zeigt eine Doppelfärbung mit dem MyD88_(internes Peptid)-Antikörper und dem fluoreszenzmarkiertem

Lektin-Helix pomatia Agglutinin (HPA) als Golgi-Marker. In A stellt sich die MyD88-Signalanhebung zwar in direkter Nähe, aber deutlich nicht im lektinmarkierten Bereich dar. B zeigt eine Endothelzelle während der Teilung. Der durch Lektin-HPA markierte Bereich liegt zwischen den beiden bereits separaten Zellkernen, die Signalanhebung durch den MyD88_(internes Peptid)-Antikörper präsentiert sich hier als gebogene Linie, die den durch den Golgi-Marker angefärbten Bereich teilweise umgibt.

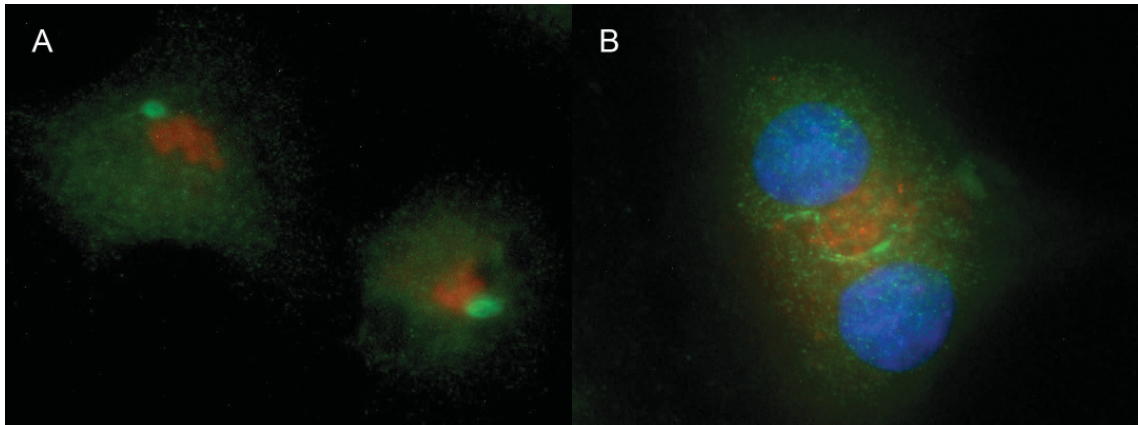


Abbildung 16: Die signalintensiven Foki der MyD88_(internes Peptid)-Färbung (grün) zeigen keine Kolokalisation zum Golgi-Apparat (rot)

Anfärbung des Golgi-Apparats (rotes Signal) und von MyD88 (grünes Signal) bei der Zelllinie EA.hy 926. In (B) außerdem Kernfärbung durch Hoechst (blaues Signal)
Die punktförmige fokale Signalanhebung in A stellt sich neben den Golgi-Apparat dar, liegt aber nicht in diesem. In B ist die Signalanhebung durch MyD88_(internes Peptid) linienförmig and umrandet den im Rahmen der Zellteilung zerfallenen Golgi-Apparat teilweise. (Vergrößerung ca. 90x)

Während sich das Muster der einzelnen fokalen Signalanhebungen bei den verschiedenen untersuchten Endothelzellarten nicht unterschied, so gab es durchaus Unterschiede in der Häufigkeit des Signals. War es bei den Zelllinien EA.hy 926 und HMEC-1 häufig zu sehen, so zeigten bei den primären Zellen HDMEC nur vereinzelte Zellen dieses Signal. Weiterhin war das Signal bei den mit EGF und Hydrocortison kultivierten HMEC-1 deutlich häufiger zu beobachten als bei den ohne diese Zusätze kultivierten HMEC-1. Dies deutet darauf hin, dass die Signalhäufigkeit mit dem Proliferationsgrad der jeweiligen Zellen zusammenhängt und deshalb bei den langsam proliferierenden primären Zellen und den HMEC-1 ohne Wachstumsfaktor weniger häufig auftrat.

Als weitere sich möglicherweise punktförmig darstellende Struktur, die zudem bei der Zellteilung mitwirkt, wurde das Zentrosom als möglicher Ort der Signalanreicherung in Betracht gezogen. Deshalb folgte nun eine Doppelfärbung von MyD88_(internes Peptid) und

γ -Tubulin, das im Zentrosom die Keimbildungsstellen für das Mikrotubuliwachstum bildet (Abbildung 17).

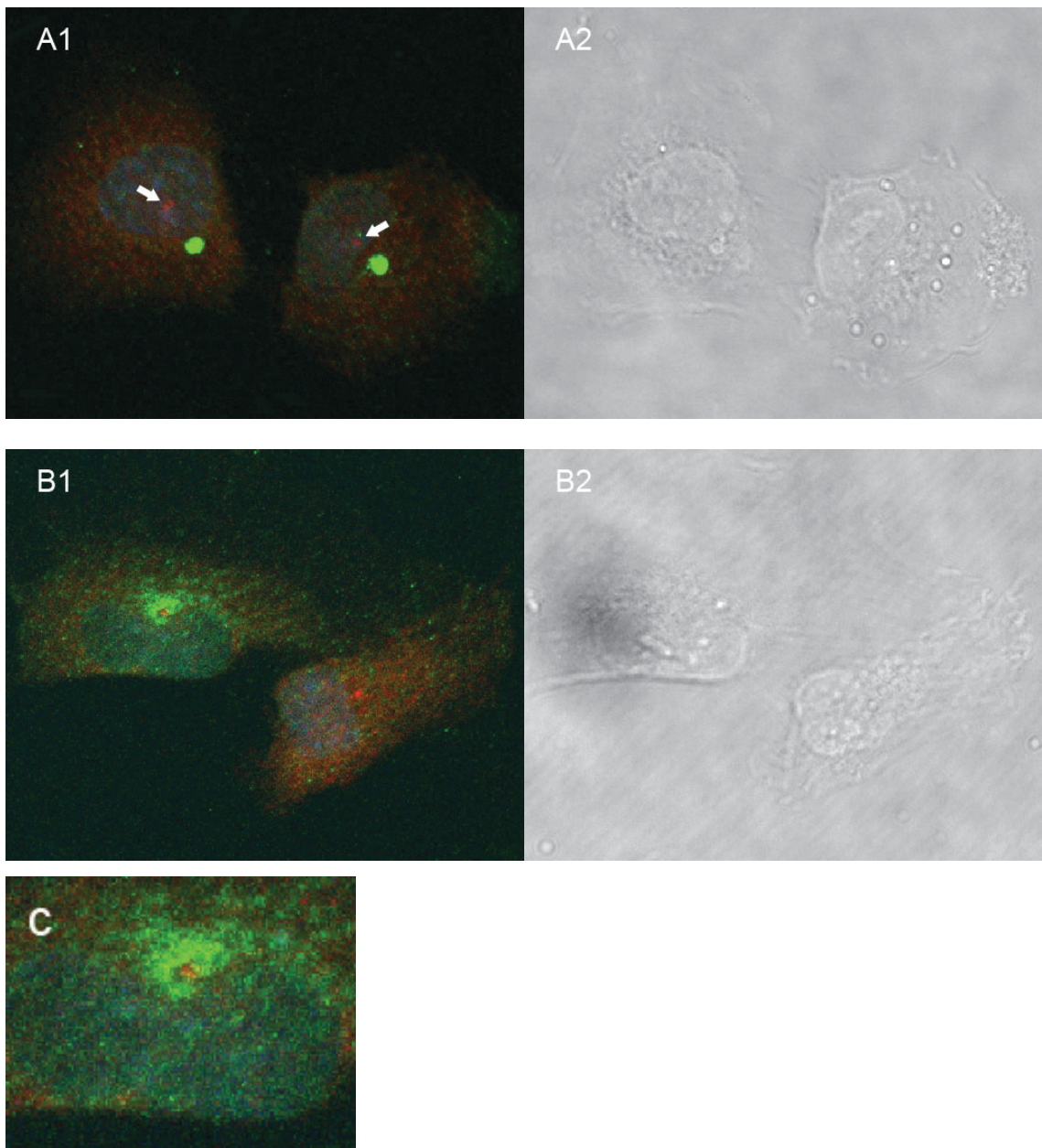


Abbildung 17: Die signalintensiven Foki der MyD88_(internes Peptid)-Färbung (grün) zeigen eine Assoziation zum Zentrosom, markiert durch γ -Tubulin (rot)

Doppelfärbung von MyD88_(internes Peptid) (grünes Signal) und γ -Tubulin (rotes Signal) bei der Zelllinie HMEC-1. Zusätzliche Anfärbung der Zellkerne durch Hoechst (blaues Signal). Das γ -Tubulin-Signal ist in (A) mit Pfeilen markiert. In B projiziert sich das γ -Tubulin Signal in der oberen Zelle in die Mitte der durch MyD88_(internes Peptid) angefarbten ringförmigen Signalanhebung. C zeigt eine Ausschnittsvergrößerung des entsprechenden Bereichs in B1. (A+B: Vergrößerung ca. 120x, C: Vergrößerung ca. 200x)

In Bild A zeigen MyD88_(internes Peptid) und γ -Tubulin getrennte Signale, die beide in Beziehung zu dem Zellkern liegen, sich aber nicht überschneiden. Bei der sich teilenden

Zelle in B/C liegen beide Signale in Bereich der Einziehung des Zellkerns, wobei das MyD88_(internes Peptid)-Signal eine ringförmige Struktur bildet. In deren Aussparung im Mittelpunkt bildet sich das Signal des γ -Tubulin-Antikörpers ab.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde zunächst die Reaktion verschiedener humaner Endothelzellen auf TLR-Stimulierung ermittelt. Bei ruhenden Endothelzellen erfolgte die Darstellung des Adapterproteins MyD88 durch Immunfluoreszenz und Immunzytochemie. Schließlich wurde die Rekrutierung von MyD88 nach Aktivierung durch TLR-Agonisten bei der Zelllinie HMEC-1 betrachtet.

4.1 Untersuchung verschiedener Endothelzellen

4.1.1 Endothelzellen und TLRs

In Einklang mit ihrer immunologischen Funktion konnten in der aktuellen Literatur auf verschiedenen humanen Endothelzellen bereits TLRs dargestellt werden.

Bei primären makrovaskulären Nabelschnurendothelzellen, den HUVEC, wurde die Expression von TLR4 sowie eine mögliche Expression von TLR2 und 3 aufgezeigt. Der Nachweis von TLR2 war dabei strittig. Die HDMEC, primäre mikrovaskuläre Hautendothelzellen, zeigten eine Expression der TLRs 2 und 4. TLR4 konnte bei den HUVEC zusätzlich in seiner Funktionalität dargestellt werden (7, 115, 116). Ebenso wurde TLR4 in humanen Koronarendothelzellen, in den Endothelzellen humaner intestinaler lymphatischer Gefäße sowie funktionelles TLR4 auf humanen mikrovaskulären dermalen lymphatischen Endothelzellen nachgewiesen (117).

Bei der sich von den HDMECs ableitenden Zelllinie HMEC-1 konnten zunächst die TLRs 1, 3, 4 und 5 sowie eine sehr schwache Expression von TLR2 nachgewiesen werden (118).

TLR5 konnte außerdem konstitutiv auf intestinalen Endothelzellen sowie HUVEC nachgewiesen werden (119), für die HUVEC wurde schließlich auch die Expression von funktionellen TLR9 (120) demonstriert.

In der aktuellen Literatur konnte die Expression und auch Funktionalität von multiplen TLRs auf verschiedenen Endothelzellen nachgewiesen werden. Bei primären lymphatischen Endothelzellen von Lunge und Haut sowie einer dermalen Endothelzelllinie der lymphatischen Gefäße konnte die Expression der TLRs 1-6 sowie

TLR9 und zusätzlich die Funktionalität von TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 und TLR6 festgestellt werden (121).

Aktuell konnten weitere TLRs auf HDMEC sowie HMEC-1 nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass bei ruhenden Zellen 7-8 der 10 TLRs, nämlich TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR9 bei den HDMECs, sowie zusätzlich dazu noch TLR10 bei den HMEC-1 auf der Genomebene exprimiert werden. Unter proinflammatorischen Bedingungen – imitiert durch die Inkubation mit den proinflammatorischen Zytokinen – konnte dabei bei HDMEC und HMEC-1 sogar die Expression der gesamten 10 humanen TLRs dokumentiert werden. Zusätzlich konnte ihre funktionelle Aktivität, nachgewiesen über die IL-8 Sekretion als frühe und die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) als späte inflammatorische Reaktion, dargestellt werden (122).

Bei der Zelllinie EA.hy 926 konnten in dieser Arbeit die gesamten TLRs mit der Ausnahme von TLR1 und TLR6 immunzytochemisch dargestellt werden.

Alle diese Untersuchungen zeigen, dass Endothelzellen als Bestandteil der inflammatorischen Reaktion ein geeignetes Untersuchungsobjekt für das Studium der TLRs darstellen. Durch ihre Lokalisation fällt Endothelien die Aufgabe zu, die Reaktion auf bereits ins System eingedrungene Pathogene mitzugenerieren. Berücksichtigt man die Verschiedenartigkeit der Endothelzellen, so ist zu erwarten, dass diese Funktion in den einzelnen Endothelzelltypen unterschiedlich stark ausgeprägt ist

4.1.2 Reaktion verschiedener Endothelzellen auf Stimulierung durch TLR-Liganden und Zytokine

In Hinblick auf die Heterogenität verschiedener Endothelzellen kann die Auswahl einer Zelllinie bedeutenden Einfluss auf die späteren Ergebnisse haben. Um eine Zelllinie für die Immunfluoreszenz auszusuchen, wurden die Zelllinien EA.hy 926 und HMEC-1 mit den primären HDMEC bezüglich Funktionalität der TLRs 3, 4 und 9 verglichen. Neben der Reaktion auf spezifische TLR-Liganden wurde dabei außerdem der Einfluss eines proinflammatorischen Milieus, vermittelt durch die Vorinkubation mit entsprechenden Zytokinen (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ), studiert. Hierbei stellte sich die Frage, inwiefern die Reaktion auf TLR-Liganden durch die Vorinkubation mit proinflammatorischen Zytokinen moduliert wird.

Als Maß der Funktionalität der TLR-Rezeptoren wurde ihre Reaktion auf TLR-Liganden und Zytokine durch die Bestimmung der IL-8 Konzentration im

Zellkulturüberstand durch einen ELISA quantifiziert. IL-8 ist ein Chemokin, das eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis und Aktivierung von Zellen myeloischen Ursprungs spielt. Da IL-8 hauptsächlich von Endothelzellen gebildet wird, stellt es somit einen geeigneten Parameter für die Bestimmung der induzierten inflammatorischen Reaktion dar.

Der Fokus wurde besonders auf Unterschiede von Endothelien unterschiedlicher Gewebeherkunft sowie Abweichungen zwischen primären und immortalisierten Zellen gleichen endothelialen Ursprungs gelegt.

Um Störfaktoren durch das Medium zu aufzudecken, wurden HMEC-1 zudem in verschiedenen Kulturmedien untersucht. Unter der Annahme, dass die Kultivierung mit Wachstumsfaktoren und Kortison Einfluss auf die Initiierung einer Entzündungsreaktion haben könnte, wurden parallel Versuche mit HMEC-1 durchgeführt, die ohne diese Zusätze kultiviert wurden. Dabei zeigte sich zwar ein ähnliches Verhältnis der Reaktion der einzelnen Liganden zueinander, vergleicht man allerdings die absoluten Werte der IL-8 Sekretion der unterschiedlich kultivierten HMEC, so zeigt sich, dass die ohne Kortison und EGF kultivierten HMEC insgesamt eine 2-3x erhöhte Steigerung der IL-8 Sekretion aufweisen. Somit bestätigte sich der Verdacht, dass auch das Medium Einfluss auf die Reaktivität der Zellen hat.

Stellt man HDMEC und HMEC-1 gegenüber, so zeigen beide vergleichbare Reaktionen auf LPS, Zytokine und die Kombination von Zytokinen und CpG-DNA. Die Reaktion auf Poly I:C konnte wegen fehlendem Zellmaterial bei den HDMEC nicht getestet werden. Auffälligkeiten gibt es bei der Reaktion auf CpG-DNA. Während die HDMEC mit einer signifikanten Minderung der IL-8 Sekretion reagieren, ist bei den HMEC-1 in diesem Versuchsaufbau kein Einfluss festzustellen. In später erfolgten Untersuchungen konnte allerdings eine Konzentrationsabhängigkeit des CpG-Effekts gezeigt werden. Hier wurde mit CpG-DNA Konzentrationen, die größer als die hier verwendeten Konzentrationen (1 μ M) waren, bei HMEC-1 ebenfalls eine signifikante Reduktion der IL-8 Sekretion nachgewiesen werden (122).

In der Gegenübertstellung der Reaktionen der verschiedenen Endothelzellen zeigen die mit Zytokinen und LPS behandelten HDMEC außerdem eine signifikante Steigerung der IL-8 Sekretion im Vergleich zu den HDMEC mit einfacher LPS-Behandlung. Dies ist bei den HMEC-1 nicht nachzuweisen.

Trotz des ähnlichen Reaktionsmusters zeigen sich die primären Zellen also reaktiver als die entsprechende Zelllinie, was sich in einer fehlenden Reaktion auf gewisse Liganden oder im Fall von CpG-DNA höherdosiert notwendigen Stimulation zum Auslösen einer Antwort äußert.

Vergleicht man HMEC-1 und HDMEC mit der Zelllinie EA.hy 926, so ist der auffälligste Unterschied die Reaktion auf LPS. Alle untersuchten Endothelien zeigen zwar eine signifikante Steigerung der IL-8 Sekretion nach LPS-Inkubation, jedoch fällt diese bei EA.hy 926 bedeutend geringer aus als bei den HMEC-1 und HDMEC. Bei der Inkubation mit CpG-DNA lässt sich bei den EA.hy 926 keine Beeinflussung der IL-8 Sekretion nachweisen.

Die Reaktionen der verschiedenen Endothelzellen auf die untersuchten Liganden sind also durchaus heterogen. Dies kann unterschiedlich gedeutet werden.

Die unterschiedliche Sensitivität von HDMEC und HMEC-1 auf CpG-DNA erklären sich vermutlich durch den Immortalisierungsprozess. Da bei Verwendung jeder Zelllinie ein Kompromiss zwischen besseren Kulturbedingungen und veränderten Eigenschaften eingegangen wird, sind abweichende Ergebnisse wahrscheinlich.

Die Unterschiede zwischen EA.hy 926 auf der einen Seite und den HDMEC und HMEC-1 auf der anderen Seite können verschiedene Ursachen haben. Die EA.hy 926 sind wie die HMEC-1 immortalisierte Zellen. Im Gegensatz zu den HMEC-1, die durch Transfektion immortalisiert wurden, handelt es sich bei den EA.hy 926 allerdings um Hybridzellen aus HUVEC und Tumorzellen. Der größere Eingriff in die ursprüngliche Endothelzelle könnten die unterschiedlichen Reaktionen erklären. Allerdings ist dieser Faktor ohne einen direkten Vergleich mit HUVEC schwer zu beurteilen. Nicht unwahrscheinlich ist allerdings, dass die unterschiedliche Herkunft der Endothelien eine Rolle spielt. Mit EA.hy 926 und HDMEC/HMEC-1 stehen sich makrovaskuläre und mikrovaskuläre Endothelzellen gegenüber. Phänotypische und funktionelle Unterschiede zwischen Endothelzellen unterschiedlichen Ursprungs konnten in verschiedenen Untersuchungen nachgewiesen werden (123, 124). Weiterhin erfüllt Endothel je nach Organherkunft spezialisierte Aufgaben. Bei den kleinen Gefäßen der Haut spielt die Teilnahme an der Immunantwort durch den Kontakt mit Pathogenen, die die Haubbarriere überwunden haben, im Sinne einer sofortigen Eindämmung einer Erregerinvasion wahrscheinlich eine große Rolle. Eine zu ausgeprägte inflammatorische Antwort könnte dagegen bei den Endothelzellen der Nabelschnur nachteilig sein, z.B.

im Sinne einer embryonalen Schädigung, was eine andere Erklärung für die schwächere Reaktion der EA.hy 926 ist.

Für die weiteren Versuche präsentieren sich die HMEC-1 als am geeignetsten. Die HDMEC sind als primäre Zellen teuer und sehr aufwendig in der Zellkultur. Außerdem sind Ergebnisse nicht ohne weiteres auf HDMEC, die von anderen Donoren stammen, übertragbar. Die EA.hy 926 zeigten sich im Vergleich zu den HMEC-1 als weniger reaktiv. Somit sind die HMEC-1 die beste Wahl für weitere Untersuchungen.

4.2 Fluoreszenzmarkierung von MyD88

4.2.1 Methoden der Fluoreszenzmarkierung

Es existieren verschiedene Methoden der Fluoreszenzmarkierung. Neben der in dieser Arbeit eingesetzten indirekten Immunfluoreszenz werden in der modernen Zellbiologie Zielproteine verstärkt mit Hilfe von GFP (grün fluoreszierendes Protein) bzw. dessen Derivaten markiert. Ursprünglich stammt GFP aus der Qualle *Aequorea victoria* und emittiert nach Anregung durch UV-Licht grünes Licht. Für die Darstellung eines Proteins kann GFP-kodierende cDNA an die DNA eines zu untersuchenden Zielproteins konjugiert werden. Nachdem diese DNA durch Transfektion in die Zelle eingebracht wurde, bildet diese wiederum zusammenhängende Proteine aus GFP und Zielprotein, wodurch eine Untersuchung der Fusionsproteine *in vivo* ermöglicht wird (125). Im Gegensatz dazu werden bei der Immunfluoreszenz Zielproteine in fixierten toten Zellen durch die Bindung von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert.

Nachteil der Darstellung durch GFP ist, dass Fusionsproteine und keine endogenen Proteine dargestellt werden. Ein signifikanter Einfluss auf Lokalisation, Interaktion und Funktion des ursprünglichen Proteins kann nicht ausgeschlossen werden. Außerdem werden die GFP-markierten Proteine durch vorgeschaltete Promotoren stark überexprimiert. Gerade bei der Untersuchung der TLRs, die unter anderem auf Nukleinsäuren reagieren, ist es von Bedeutung, dass die Zellen durch das Einbringen von Fremd-DNA voraktiviert werden können. Um diese Interferenzen auszuschließen, wurde endogenes MyD88 hier über indirekte Immunfluoreszenz dargestellt. Da dennoch die Dynamik der MyD88-Rekrutierung erfasst werden sollte, wurden die Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten fixiert und gefärbt.

4.2.2 Lokalisation von MyD88 bei ruhenden Endothelzellen

Um die Verteilung in ruhenden Zellen darzustellen, wurde endogenes MyD88 durch Immunzytochemie und Immunfluoreszenz markiert. Dafür wurden zwei Antikörper gegen verschiedene Epitope von MyD88 verwendet (MyD88_(internes Peptid) und MyD88_(C-terminales Peptid)), die interessanterweise ein unterschiedliches Lokalisationsmuster ergaben.

Der Antikörper gegen das C-terminale Peptid von MyD88 bewirkt in der Immunzytochemie eine perinukleär betonte Anfärbung des Zytoplasmas. In der Immunfluoreszenz stellt sich MyD88 als über das Zytoplasma verteilte, im Kernbereich betonte feine Granulierung dar. Dieses leicht körnige Muster ist bei allen untersuchten Endothelzellen (EA.hy 926, HDMEC und HMEC-1) nachweisbar. Der zweite Antikörper MyD88_(internes Peptid) zeigt neben diesem feingranulären Muster bei einem variablen Prozentsatz der Zellen zusätzlich eine fokale Signalanreicherung mit unterschiedlicher Morphologie. Diese stellt sich meist punktförmig mit angedeuteten Ausläufern, aber auch häufig ring-, komma- oder halbkreisförmig dar. Der Prozentsatz der Zellen, die diese Foki zeigen, variiert bei den verschiedenen Endothelzelltypen. Außerdem hat die Mediumzusammensetzung Einfluss auf das quantitative Auftreten dieses Signals.

Um das Kompartiment dieser Anreicherung zu identifizieren wurde zusätzlich zu der MyD88-Markierung eine Fluoreszenzfärbung des Golgi-Apparats (Lektin) und der Zentrosomen (γ -Tubulin) vorgenommen. Dadurch konnte in dieser Arbeit dargestellt werden, wie sich γ -Tubulin bei teilenden Zellen genau in die Aussparung der ringförmigen Signalanreicherung durch MyD88 projiziert, was auf eine Assoziation der Foki mit dem Mikrotubuli-Organisationszentrum (microtubule organizing center/MTOC) schließen lässt.

In aktuellen Publikationen wird MyD88 in der Regel als mit GFP oder dessen Derivat markiertes Fusionsprotein dargestellt. Mit dieser Methode wurden verschiedene Zelltypen wie HEK-293 (eine Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen), HeLa (eine humane epitheliale Linie, die sich von den Zellen eines Zervixkarzinoms ableitet) und RAW 264.7 (eine murine Makrophagenlinie) untersucht. Dabei kommt es zu sehr unterschiedlichen Darstellungen von MyD88. In vielen Untersuchungen kann MyD88 in vereinzelt kondensierten Foki dargestellt werden. Diese zeigen sich bei HEK (47, 84, 88) und RAW 264.7 (84, 126). In Nishiya et al. (59) ist MyD88 ebenfalls auf

einzelne Foki konzentriert, welche allerdings eine deutlich andere Morphologie aufweisen. In einigen Publikationen stellt sich MyD88 eher als sehr grobe Granulierung dar. Diese zeigt sich sowohl bei HEK als auch bei HeLa (60). Ein ähnliches Muster besitzt die Darstellung von HeLa-Zellen in Jaunin et al. (127). Im Gegensatz zu den zitierten Publikationen wird hier zur Darstellung aber nicht GFP, sondern ein Fusionsprotein aus MyD88 und einem immunogenen Peptid („FLAG“) eingesetzt. Dieses MyD88-FLAG-Protein wird wiederum durch eine entsprechende Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Eine feinere Granulierung zeigt sich für GFP-markiertes MyD88 bei RAW 264.7 in Ahmad-Nejad et al. (48) und bei murinen dendritischen Zellen und Makrophagen in Latz et al. (54).

Die beiden zuletzt angeführten Darstellungen weisen die größte Ähnlichkeit zu dem mit dem MyD88_(C-terminales Peptid)-Antikörper ermittelten Muster auf. Allerdings zeigten die RAW 264.7 in Ahmad-Nejad et al (48) eine perinukleäre Signalminderung während in dieser Arbeit im Kernbereich eine Signalverstärkung festzustellen war. Die größte Übereinstimmung zeigt sich im Vergleich mit den murinen dendritischen Zellen und Makrophagen in Latz et al. (54), die in Ruhe eine relativ homogene feingranuläre zytoplasmatische Verteilung von MyD88 aufwiesen. Die durch den MyD88_(internes Peptid)-Antikörper dargestellten Foki sind den Morphologien in Nishiya et al. (59) sehr ähnlich. Dort wurden sie als punkt-, stern-, ring-, faden- oder kokonartige Signalanreicherung beschrieben und eine Doppelmarkierung mit dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat, den Lysosomen und Endosomen sowie den zytoskelettalen Bestandteilen F-Actin und α -Tubulin zeigte keine klare Kollokalisierung.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die angeführten Publikationen kein einheitliches Bild der Verteilung von MyD88 in der Zelle liefern können. Deutliche Unterschiede lassen sich sogar bei verschiedenen Darstellungen der gleichen Zelllinie ausmachen (vgl. (60, 88)). Als mögliche Ursachen sind hier Artefakte durch die GFP-Markierung zu diskutieren. In den hier durchgeführten Untersuchungen zur Lokalisation des endogenen MyD88 ließ sich dieses in ruhenden Zellen als perinukleär betonte feine Granulierung darstellen, zusätzlich zeigten sich bei einem der verwendeten Antikörper gegen MyD88 singuläre signalintense Anreicherungen. In weiterführenden Untersuchungen fanden sich gute Hinweise auf eine Assoziation der Anreicherungen mit dem MTOC in Endothelzellen.

4.2.3 Rekrutierung von MyD88 bei TLR-Stimulierung

Um die Translokation von endogenem MyD88 in der Zelle nach Aktivierung durch LPS (TLR4) und CpG-DNA (TLR9) darzustellen, wurden Zellen der Linie HMEC-1 nach einer Inkubation von 5 Minuten, 10 Minuten oder 4 Stunden durch Immunfluoreszenz mit dem Antikörper MyD88_(internes Peptid) markiert. Für den Zeitraum von 5-10 Minuten konnte eine Translokation von MyD88 beobachtet werden. Das Signal fand sich nach Inkubation mit CpG-DNA gehäuft im Kernbereich und nach Inkubation mit LPS an der Plasmamembran. Nach 4 Stunden Inkubation mit den Liganden entsprach die Verteilung wieder dem Ruhezustand. Bei den teilweise zu beobachtenden signalreichen Foki zeigte sich keine Beeinflussung durch die Aktivierung.

Bei den bisher publizierten Untersuchungen zur Rekrutierung von MyD88, bei denen die Darstellung durch MyD88/GFP-Fusionsproteine erfolgte, finden sich in der aktuellen Literatur sehr unterschiedliche Ergebnisse.

In Ahmad-Nejad et al (48) entspricht das Translokationsmuster weitgehend dem hier ermittelten. Bei einer Zelllinie aus murinen Makrophagen (RAW 264.7) führt CpG-DNA zu einer verstärkten Konzentration von MyD88 in den Vesikeln, LPS zu einem verstärkten Signal an der Zellmembran. Allerdings weicht der Zeitraum mit 45 Minuten erheblich von den hier ermittelten 5-10 Minuten ab. Die murinen dendritischen Zellen in Latz et al. (54) zeigen bereits nach 5-minütiger Inkubation mit CpG-DNA eine Änderung des MyD88-Musters. Dieses wird nun als vereinzelte grobe Granula dargestellt und zeigt eine Kollokalisierung mit CpG-DNA.

In HEK-293 Zellen (47) zeigte sich nach Behandlung mit LPS eine Umverteilung von MyD88, welches sich im Ruhezustand in einzelnen kondensierten Foki befindet. Nach einem Zeitraum von 15 Minuten präsentiert MyD88 sich als grobe Granulierung nahe der Zellmembran.

In Hornef et al. (49) wurde eine humane Kryptenepithelzelllinie aus dem Darm (m-IC_{C12}) untersucht. Die Translokation von MyD88 erfolgt mit 15 Minuten in einen ähnlichen Zeitraum, jedoch mit einem sehr unterschiedlichen Verteilungsmuster. In Ruhe in groben Granula diffus über das Zytoplasma verteilt, kondensierte MyD88 nach Stimulierung mit LPS im perinukleären Bereich. Diese Beobachtung wurde neben der Darstellung durch GFP außerdem mit Immunzytochemie bestätigt.

Auch hier können die sehr unterschiedlichen Ergebnisse durch die Färbmethode begründet sein. Außerdem ist es nicht eindeutig zu beurteilen, inwiefern die

Unterschiede Charakteristika der jeweiligen Zellen oder artifizielles Produkt der Versuchsbedingungen oder Färbemethode sind. Die einzige Studie, die zusätzlich zu der GFP-Markierung auch endogenes MyD88 untersucht (49), studiert mit den Kryptenepithelzellen sehr spezielle Zellen. Dementsprechend zeigt MyD88 nach Stimulierung ein Lokalisierungsmuster, das sich deutlich von den Ergebnissen für anderen Zelltypen sowie auch dem hier ermittelten unterscheidet. Für Endothelzellen hatte sich hier eine Translokation des endogenen MyD88 durch eine Vergrößerung der Granulierung sowie eine Umverteilung in Richtung Kernbereich (TLR9) bzw. Plasmamembran (TLR4) in einem Zeitraum von 5-10 Minuten ergeben.

4.2.4 Beurteilung der variablen Darstellungsmuster

Die Darstellung von MyD88 in ruhenden oder aktivierten Zellen stellt sich in der aktuellen Literatur sehr heterogen dar. Dies betrifft sowohl das eigentliche Färbemuster als auch den Zeitraum, in dem bei stimulierten Zellen die Translokation und Rekrutierung von MyD88 erfolgt. Die Verwendung von GFP oder anderen fluoreszierenden Proteinen zur Darstellung könnte dabei Hinweise auf die Ursache dieser vielfältigen Abweichungen geben. Trotz der dokumentierten relativ guten Ergebnisse bei der Verwendung von GFP ist nicht auszuschließen, dass sich das entsprechende Fusionsprotein anders verhält als das endogene Protein. Dies kann vielfache Ursachen haben, z.B. sterische Behinderung wegen des relativ großen Fusionsproteins, das GFP im Gegensatz zu anderen Markerproteinen darstellt. Auch die unterschiedlichen Transfektionsmethoden und Fusionsproteine könnten zu den variablen Darstellungen führen. Oft werden Promotoren vorgeschaltet, die zu einer hohen Expression des Fusionsproteins führen, was zu einer Überexpression mit Akkumulation von Protein in der Zelle führen kann. Dieser sogenannte ER-Stress kann eine veränderte Reaktivität der Zelle bis hin zur Apoptose zur Folge haben. Gerade bei Versuchsmodellen, die sich mit der Reaktion auf Pathogene befassen, gibt es noch weitere mögliche Interferenzen. Vielfach sind die untersuchten Zellen nur transient transfiziert. Durch das Einbringen eines Plasmids wird aber mit prokaryotischer DNA auch unmethylierte CpG-DNA in die Zelle eingebracht. Somit sind die Zellen voraktiviert, was Einfluss auf spätere Untersuchungsergebnisse nimmt. Unter diesem Gesichtspunkt erscheinen vor allem die Ergebnisse von Versuchen mit CpG-DNA - wenn sie ohne nicht-transfizierte Kontrollen gemacht wurden - fragwürdig.

Sehr vielfältige Darstellungen in der Literatur lassen vermuten, dass dieses Bild je nach Zellart deutlich divergieren kann. Außerdem kann von den unterschiedlichen Ergebnissen bei gleichen Zelltypen auf Schwierigkeiten bei der Darstellung von MyD88 durch ein GFP-Fusionsprotein geschlossen werden.

Diese veränderten Eigenschaften des Fusionsproteins und Einflüsse auf die Zelle bei der Transfektion existieren beim Nachweis des endogenen Proteins über indirekte Immunfluoreszenz nicht. Hier wird nur das Protein detektiert, das physiologisch exprimiert wird. Die verschiedenen Ergebnisse bei Experimenten mit den gleichen Zellen können somit artifiziell durch die Methodewahl entstanden sein. Die Darstellung durch Immunfluoreszenz ist zwar in ihrer dynamischen Anwendung begrenzt (d.h. es sind keine Beobachtungen *in vivo* möglich), aber vor der Fixierung muss die Zelle für die Markierung als solche nicht manipuliert werden, wodurch es weniger Möglichkeiten für Artefakte gibt. Somit sind ihre Ergebnisse verlässlicher als die der GFP-Markierung.

Die hier in der Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper haben überraschenderweise unterschiedliche Färbemuster ergeben. Bei den Antikörper gegen ein internes Peptid waren zusätzlich zu einer feingranulären Färbung des Zytoplasmas singuläre isolierte signalintense Foki im Bereich des Zellkerns nachweisbar. Diese waren für den zweiten Antikörper, welcher sich gegen ein C-terminales Epitop richtete, das also in Nähe zu der TIR-Domäne liegt, nicht nachweisbar. Es stellt sich die Frage, wie die unterschiedlichen Färbemuster der beiden eingesetzten Antikörper zustande kommen. Als Mechanismus könnten Bindungsstellen durch Interaktion mit anderen Proteinen zeitweise blockiert werden. Der MyD88_(C-terminales Peptid)-Antikörper zeigt nicht die Signalanreicherung des MyD88_(internes Peptid)-Antikörpers, präsentierte in der Immunzytochemie aber eine stärkere Färbung. Möglicherweise sind in der kondensierten fokalen Form die Bindungsstellen des MyD88_(C-terminales Peptid)-Antikörpers blockiert, sodass das Färbemuster keine signalreichen Foki zeigt. Mit Blick auf die Literatur ist auffällig, dass trotz der zahlreichen Publikationen mit HEK-293 eine ähnliche Struktur nur bei Nishiya et al. (59) dargestellt werden konnte. Eventuell sind in der kondensierten Form von MyD88 verstärkt mögliche Bindungsstellen besetzt oder die Antikörper bzw. die jeweiligen GFP-Fusionsproteine werden durch sterische Faktoren oder elektrostatische Wechselwirkungen an einer Bindung gehindert. Zwar konnte MyD88 auch in anderen Publikationen bei ruhenden Zellen in Foki dargestellt werden, diese unterscheiden sich morphologisch aber deutlich von den in dieser Arbeit und denen in Nishiya et al. (59)

gezeigten. Insgesamt ist davon auszugehen, dass diese Signalanreicherungen nicht auf Endothelzellen begrenzt somit vermutlich bei weiteren Zelltypen anzutreffen sind.

Die in dieser Arbeit beobachtete Morphologie der Signalanreicherungen legt ein Zusammenspiel mit Strukturen des Zytoskeletts nahe. Im Einklang dazu konnte in Jaunin et al. (127) eine Assoziation von MyD88 mit aktinreichen Fasern beschrieben werden. Im Kontext der in dieser Arbeit beobachteten Kolo-kalisation mit γ -Tubulin kann die Signalanreicherung dem MTOC zugeordnet werden. In diesem Zusammenhang ist es außerdem auffällig, dass die verschiedenen Endothelzellen diese signalreichen Foki in unterschiedlichem Ausmaß aufweisen. Sie sind in einem größeren Prozentsatz bei Endothelzellen mit höheren Proliferationsraten aufzufinden. Dies zeigte sich besonders im Vergleich der ohne weitere Mediumzusätze kultivierten HMEC-1 mit den HMEC-1, deren Medium zusätzlich Wachstumsfaktor und Kortison enthielt. Auch hier besteht die Möglichkeit, dass im Verlauf des Zellzyklus Bindungsstellen blockiert werden, wodurch die kondensierte Form von MyD88 nicht markiert wird.

5 Zusammenfassung

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die subzelluläre Verteilung von endogenem MyD88 sowohl in ruhenden Endothelzellen als auch nach Aktivierung durch TLR-spezifische Liganden darzustellen.

Dazu wurde zunächst die Funktionalität ausgewählter TLRs – nämlich TLR3, TLR4 und TLR9 - bei verschiedenen Endothelzellen (Ea.hy 926, HMEC-1 und HDMEC) untersucht. Durch einen ELISA wurde dabei die IL-8 Sekretion nach Stimulation mit TLR-spezifischen Liganden sowohl in ruhendem Zustand als auch nach Voraktivierung durch proinflammatorische Zytokine bestimmt. Die Funktionalität des jeweiligen TLRs konnte sich in einer Steigerung aber auch in einer signifikanten Verminderung der IL-8 Sekretion äußern. Die verschiedenen Endothelzellen zeigten erwartungsgemäß differenzierte Antworten auf die Stimulation, was sich einerseits durch die Gegenüberstellung von primären Zellen und Zelllinien erklärt, aber andererseits auch deutlich auf die funktionellen Unterschiede der vielfältigen Endothelzelltypen unterschiedlicher Gewebeherkunft verweist. Ebenso war eine Modulation der Reaktivität durch die Zellkulturmediumzusammensetzung am Beispiel der Zelllinie HMEC-1 festzustellen.

Für die Darstellung von endogenem MyD88 durch Immunfluoreszenz wurden Endothelzellen der Hautzelllinie HMEC-1, welche den besten Kompromiss bezüglich Reaktivität und einfacherer Handhabung in der Zellkultur gezeigt hatten, ausgewählt. Zur Immunfluoreszenzfärbung wurden zwei Antikörper gegen unterschiedliche Epitope (gegen ein internes Peptid sowie ein C-terminales Peptid) von MyD88 verwendet. Dabei zeigte sich bei den untersuchten ruhenden Endothelzellen für beide Antikörper eine diffus über das Zytoplasma verteilte Anordnung von endogenem MyD88. Überraschenderweise konnte mit dem Antikörper gegen das interne Peptid von MyD88 zusätzlich zu der diffusen Verteilung eine kondensierte Signalanreicherungen mit räumlichen Bezug zum Zellkern dargestellt werden. Ein ähnliches Bild hatte eine Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinie EA.hy 926 mit dem gleichen Antikörper ergeben. Die kondensierten Foki waren von der Aktivierung durch TLR-spezifische Liganden unbeeinflusst, allerdings traten sie gehäuft bei stärker proliferierenden Zellen auf. Eine Kolo-kalisation mit γ -Tubulin ließ auf einen Assoziation mit dem MTOC schließen.

Durch Stimulierung mit TLR-spezifischen Liganden konnte eine ligandenspezifische Lokalisation des ansonsten diffus verteilten MyD88 bewirkt werden. Es kam zu einer Vergrößerung der Granulierung und Umverteilung dieser in Richtung Kernbereich (TLR9) oder Plasmamembran (TLR4). Diese Umverteilung von endogenem MyD88 geschah in einem Zeitraum von 5-10 Minuten.

6 Literaturverzeichnis

1. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124(4):783-801.
2. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86(6):973-83.
3. Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991;351(6325):355-6.
4. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388(6640):394-7.
5. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998;282(5396):2085-8.
6. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J Immunol* 1999;162(7):3749-52.
7. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004;303(5663):1522-6.
8. Sandor F, Buc M. Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands. *Folia Biol (Praha)* 2005;51(5):148-57.
9. Parker LC, Prince LR, Sabroe I. Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin Exp Immunol* 2007;147(2):199-207.
10. Hopkins PA, Sriskandan S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol* 2005;140(3):395-407.
11. Sandor F, Buc M. Toll-like receptors. II. Distribution and pathways involved in TLR signalling. *Folia Biol (Praha)* 2005;51(6):188-97.
12. Chaturvedi A, Pierce SK. How location governs toll-like receptor signaling. *Traffic* 2009;10(6):621-8.
13. Bowie AG. Translational mini-review series on Toll-like receptors: recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in anti-viral immunity. *Clin Exp Immunol* 2007;147(2):217-26.
14. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004;430(6996):257-63.
15. Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 2004;76(3):514-9.
16. Wakelin SJ, Sabroe I, Gregory CD, Poxton IR, Forsythe JL, Garden OJ, et al. "Dirty little secrets"--endotoxin contamination of recombinant proteins. *Immunol Lett* 2006;106(1):1-7.
17. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol* 2007.

18. Zughayer SM, Zimmer SM, Datta A, Carlson RW, Stephens DS. Differential induction of the toll-like receptor 4-MyD88-dependent and -independent signaling pathways by endotoxins. *Infect Immun* 2005;73(5):2940-50.
19. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408(6813):740-5.
20. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003;198(3):513-20.
21. Hemmi H, Kaisho T, Takeda K, Akira S. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol* 2003;170(6):3059-64.
22. Krieg AM. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nat Med* 2003;9(7):831-5.
23. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413(6857):732-8.
24. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999;189(11):1777-82.
25. Kato A, Ogasawara T, Homma T, Saito H, Matsumoto K. Lipopolysaccharide-binding protein critically regulates lipopolysaccharide-induced IFN-beta signaling pathway in human monocytes. *J Immunol* 2004;172(10):6185-94.
26. Jiang Z, Georgel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, et al. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol* 2005;6(6):565-70.
27. Manukyan M, Triantafilou K, Triantafilou M, Mackie A, Nilsen N, Espevik T, et al. Binding of lipopeptide to CD14 induces physical proximity of CD14, TLR2 and TLR1. *Eur J Immunol* 2005;35(3):911-21.
28. Lee HK, Dunzendorfer S, Soldau K, Tobias PS. Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity* 2006;24(2):153-63.
29. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 2003;197(9):1107-17.
30. Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 2005;433(7025):523-7.
31. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007;7(5):353-64.
32. Janssens S, Beyaert R. A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem Sci* 2002;27(9):474-82.
33. Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 2003;4(2):161-7.
34. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002;420(6913):324-9.
35. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11(1):115-22.

36. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003;301(5633):640-3.
37. Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 2003;278(50):49751-62.
38. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003;4(11):1144-50.
39. Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* 2006;7(10):1074-81.
40. Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E, Tancredi S, et al. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* 2005;174(5):2942-50.
41. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006;13(5):816-25.
42. Albers B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, et al. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. 2., korrigierte Aufl.* ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 2001.
43. Nishiya T, DeFranco AL. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J Biol Chem* 2004;279(18):19008-17.
44. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999;401(6755):811-5.
45. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 2001;167(4):1882-5.
46. Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M, et al. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 2000;164(7):3471-5.
47. Latz E, Visintin A, Lien E, Fitzgerald KA, Monks BG, Kurt-Jones EA, et al. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J Biol Chem* 2002;277(49):47834-43.
48. Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 2002;32(7):1958-68.
49. Hornef MW, Normark BH, Vandewalle A, Normark S. Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 2003;198(8):1225-35.
50. Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, et al. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 2003;171(6):3154-62.
51. Funami K, Matsumoto M, Oshiumi H, Akazawa T, Yamamoto A, Seya T. The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. *Int Immunol* 2004;16(8):1143-54.

52. Nishiya T, Kajita E, Miwa S, Defranco AL. TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J Biol Chem* 2005;280(44):37107-17.
53. Leifer CA, Kennedy MN, Mazzoni A, Lee C, Kruhlak MJ, Segal DM. TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J Immunol* 2004;173(2):1179-83.
54. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004;5(2):190-8.
55. Hacker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, et al. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *Embo J* 1998;17(21):6230-40.
56. Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, et al. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(11):6646-51.
57. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 2006;7(1):49-56.
58. Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 2006;125(5):943-55.
59. Nishiya T, Kajita E, Horinouchi T, Nishimoto A, Miwa S. Distinct roles of TIR and non-TIR regions in the subcellular localization and signaling properties of MyD88. *FEBS Lett* 2007;581(17):3223-9.
60. Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, et al. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(43):15416-21.
61. Rowe DC, McGettrick AF, Latz E, Monks BG, Gay NJ, Yamamoto M, et al. The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(16):6299-304.
62. Lord KA, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene* 1990;5(7):1095-7.
63. Lord K, Abdollahi A, Hoffman-Liebermann B, Liebermann D. Dissection of the immediate early response of myeloid leukemia cells to terminal differentiation and growth inhibitory stimuli. *Cell Growth Differ* 1990;1(12):637-645.
64. Hultmark D. Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;199(1):144-6.
65. Bonnert TP, Garka KE, Parnet P, Sonoda G, Testa JR, Sims JE. The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. *FEBS Lett* 1997;402(1):81-4.
66. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998;2(2):253-8.
67. Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 1997;278(5343):1612-5.
68. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997;7(6):837-47.

69. Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med* 2006;84(9):712-25.
70. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17(1):1-14.
71. Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(8):5567-72.
72. Suzuki N, Suzuki S, Yeh WC. IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity. *Trends Immunol* 2002;23(10):503-6.
73. Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, et al. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 2002;416(6882):750-6.
74. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996;383(6599):443-6.
75. Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, et al. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 1999;13(8):1015-24.
76. Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, et al. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000;103(2):351-61.
77. Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nat Cell Biol* 2005;7(8):758-65.
78. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001;412(6844):346-51.
79. Adhikari A, Xu M, Chen ZJ. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene* 2007;26(22):3214-26.
80. Shim JH, Xiao C, Paschal AE, Bailey ST, Rao P, Hayden MS, et al. TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev* 2005;19(22):2668-81.
81. Lee J, Mira-Arbibe L, Ulevitch RJ. TAK1 regulates multiple protein kinase cascades activated by bacterial lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* 2000;68(6):909-15.
82. Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, et al. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005;6(11):1087-95.
83. Carmody RJ, Chen YH. Nuclear factor- κ B: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cell Mol Immunol* 2007;4(1):31-41.
84. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 2005;434(7030):243-9.
85. Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2006;6(9):644-58.
86. Ito T, Wang YH, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immunopathol* 2005;26(3):221-9.
87. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004;5(12):1219-26.

88. Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, et al. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 2004;5(10):1061-8.
89. Uematsu S, Sato S, Yamamoto M, Hirotsu T, Kato H, Takeshita F, et al. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction. *J Exp Med* 2005;201(6):915-23.
90. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5(10):987-95.
91. Pulendran B, Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* 2006;124(4):849-63.
92. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 2007;13(5):552-9.
93. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(5):979-87; quiz 988.
94. Horner AA. Toll-like receptor ligands and atopy: a coin with at least two sides. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(5):1133-40.
95. Miller RL, Gerster JF, Owens ML, Slade HB, Tomai MA. Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *Int J Immunopharmacol* 1999;21(1):1-14.
96. Kang SS, Kauls LS, Gaspari AA. Toll-like receptors: applications to dermatologic disease. *J Am Acad Dermatol* 2006;54(6):951-83; quiz 983-6.
97. Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4(8):444-54.
98. Ward JR, Wilson HL, Francis SE, Crossman DC, Sabroe I. Translational mini-review series on immunology of vascular disease: inflammation, infections and Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Clin Exp Immunol* 2009;156(3):386-94.
99. Leaver SK, Finney SJ, Burke-Gaffney A, Evans TW. Sepsis since the discovery of Toll-like receptors: disease concepts and therapeutic opportunities. *Crit Care Med* 2007;35(5):1404-10.
100. Romics L, Jr., Szabo G, Coffey JC, Wang JH, Redmond HP. The emerging role of toll-like receptor pathways in surgical diseases. *Arch Surg* 2006;141(6):595-601.
101. Rahman AH, Eisenberg RA. The role of toll-like receptors in systemic lupus erythematosus. *Springer Semin Immunopathol* 2006;28(2):131-43.
102. Christensen SR, Shlomchik MJ. Regulation of lupus-related autoantibody production and clinical disease by Toll-like receptors. *Semin Immunol* 2007;19(1):11-23.
103. Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J Immunol* 2007;178(10):6017-22.
104. Opitz B, Hippenstiel S, Eitel J, Suttorp N. Extra- and intracellular innate immune recognition in endothelial cells. *Thromb Haemost* 2007;98(2):319-26.
105. Fitzner N. Die Expression von funktionellen Toll-like Rezeptoren auf humanen Hautendothelzellen als essentieller Faktor in der Entzündungsreaktion. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2006.

106. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80(12):3734-7.
107. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, et al. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 1992;99(6):683-90.
108. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989;84(4):1045-9.
109. Hack CE, Hart M, van Schijndel RJ, Eerenberg AJ, Nuijens JH, Thijs LG, et al. Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators. *Infect Immun* 1992;60(7):2835-42.
110. Martich GD, Danner RL, Ceska M, Suffredini AF. Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of antiinflammatory agents. *J Exp Med* 1991;173(4):1021-4.
111. Livaditi O, Kotanidou A, Psarra A, Dimopoulou I, Sotiropoulou C, Augustatou K, et al. Neutrophil CD64 expression and serum IL-8: sensitive early markers of severity and outcome in sepsis. *Cytokine* 2006;36(5-6):283-90.
112. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2009;84(3):353-60.
113. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(21):6735-41.
114. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
115. Hijjiya N, Miyake K, Akashi S, Matsuura K, Higuchi Y, Yamamoto S. Possible involvement of toll-like receptor 4 in endothelial cell activation of larger vessels in response to lipopolysaccharide. *Pathobiology* 2002;70(1):18-25.
116. Tissari J, Siren J, Meri S, Julkunen I, Matikainen S. IFN-alpha enhances TLR3-mediated antiviral cytokine expression in human endothelial and epithelial cells by up-regulating TLR3 expression. *J Immunol* 2005;174(7):4289-94.
117. Sawa Y, Ueki T, Hata M, Iwasawa K, Tsuruga E, Kojima H, et al. LPS-induced IL-6, IL-8, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human lymphatic endothelium. *J Histochem Cytochem* 2008;56(2):97-109.
118. Faure E, Equils O, Sieling PA, Thomas L, Zhang FX, Kirschning CJ, et al. 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* 2000;275(15):11058-63.
119. Maaser C, Heidemann J, von Eiff C, Luger A, Spahn TW, Binion DG, et al. Human intestinal microvascular endothelial cells express Toll-like receptor 5: a binding partner for bacterial flagellin. *J Immunol* 2004;172(8):5056-62.
120. El Kebir D, Jozsef L, Pan W, Wang L, Filep JG. Bacterial DNA activates endothelial cells and promotes neutrophil adherence through TLR9 signaling. *J Immunol* 2009;182(7):4386-94.
121. Pegu A, Qin S, Fallert Junecko BA, Nisato RE, Pepper MS, Reinhart TA. Human lymphatic endothelial cells express multiple functional TLRs. *J Immunol* 2008;180(5):3399-405.
122. Fitzner N, Clauberg S, Essmann F, Liebmann J, Kolb-Bachofen V. Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15(1):138-46.

123. Swerlick RA, Lee KH, Wick TM, Lawley TJ. Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J Immunol* 1992;148(1):78-83.
124. Swerlick RA, Lee KH, Li LJ, Sepp NT, Caughman SW, Lawley TJ. Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *J Immunol* 1992;149(2):698-705.
125. Rizzuto R, Brini M, Pizzo P, Murgia M, Pozzan T. Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Curr Biol* 1995;5(6):635-42.
126. Honda K, Ohba Y, Yanai H, Negishi H, Mizutani T, Takaoka A, et al. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* 2005;434(7036):1035-40.
127. Jaunin F, Burns K, Tschopp J, Martin TE, Fakan S. Ultrastructural distribution of the death-domain-containing MyD88 protein in HeLa cells. *Exp Cell Res* 1998;243(1):67-75.

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Aktivatorprotein-1
APC	antigenpräsentierende Zelle
BSA	bovines Serumalbumin
CD	„cluster of differentiation“
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CMV	Cytomegalie-Virus
CXC	Cystein-X-Cystein
DD	„death domain“
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsRNA	doppelsträngige RNA
EC	Endothelzellen
ECGF	„endothelial cell growth factor“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	„epidermal growth factor“
ER	endoplasmatisches Retikulum
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
FKS	fötale Kälberserum
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
H(A)T	Hypoxanthin, (Aminopterin,) Thymidin
HDMEC	humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
HIV	humanes Immunschwäche-Virus
HMEC	humane mikrovaskuläre Endothelzellen

HPA	Helix pomatia Agglutinin
HPGRTase	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	„horseradish peroxidase“
HSP	Hitzeschockprotein
HSV	Herpes simplex-Virus
HUVEC	„human umbilical vein endothelial cells“
IAV	Influenza A-Virus
ICC	Immunzytochemie
Ig	Immunglobulin
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IL	Interleukin
I-Kappa-B	„Inhibitor of KappaB“
IKK	„I-Kappa-B kinase“
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRAK	„interleukin-1 receptor-associated kinase“
IRF 5	„interferon regulatory factor 5“
JNK	„c-Jun N-terminal kinase“
LPB	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LDL	„low density lipoprotein“
LRR	„leucine rich repeat“
LSAB	Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode
Mal	„MyD88-adapter-like“
MAP3K	„mitogen-activated protein kinase kinase kinase“
MD-2	„myeloid differentiation-2“
MKK	„MAP (mitogen-activated protein) kinase kinase“

MyD88	„myeloid differentiation factor 88“
MTOC	„microtubule organizing center“
NEMO	„NF-κB essential modulator“
NF-κB	„Nuclear factor-κB“
Pam ₃ CSK ₆	„palmitoyl-3-cysteine-serine-lysine-6“
PAMP	„pathogen associated molecular patterns“
PBS	„phosphate buffered saline“
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PFA	Paraformaldehyd
Poly I:C	„polyinosinic-polycytidylic acid“
PRR	„pattern recognition receptors“
RSV	„respiratory syncytial-virus“
SARM	„sterile alpha and HEAT/ <i>Armadillo</i> motif“
SLE	systemischer Lupus erythematosus
snRNPs	„small nuclear ribonucleoproteins“
ssRNA	einzelsträngige RNA
SV40	„simian virus 40“
TAB-1	„TAK-1-binding protein-1“
TAK-1	„transforming growth factor-activated kinase-1“
TBS	„Tris buffered saline“
T _H	T-Helfer
TICAM	„TIR-containing adaptor molecule“
TIR	„Toll/IL-1 receptor homology domain“
TIRAP	„Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein“
TK	Thymidinkinase
TLR	„Toll-like receptor“
TNF	Tumornekrosefaktor

TRAF	„TNF receptor associated factor“
TRAM	„TRIF-related adaptor molecule“
TRIF	„TIR domain-containing adapter inducing interferon- β “
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ubc/Uev	„E2 ubiquitin-conjugating enzyme/ ubiquitin-conjugating E2 enzyme variant“
VSV	„vesicular stomatitis-virus“
vWF	von-Willebrand-Faktor

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sigrid Clauberg

Geburtsort: Neuss

Schulbildung:

1987-1991 Grundschule Weißenberg-West, Neuss

1991-2000 Marie-Curie Gymnasium, Neuss

06/00 Abitur

Studium:

10/00-09/07 Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

04/06-03/07 Praktisches Jahr: Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf

04/07 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Beruf:

02/08-06/09 Assistenzärztin Medizinische Klinik III/IV
Alfried Krupp Krankenhaus Essen-Steele/ Lutherhaus

ab 07/09 Assistenzärztin HNO-Klinik Kath. Krankenhaus St. Josef
Essen-Werden