

**Angeborenes Immunsystem und
akutes Lungenversagen:
Bedeutung von Toll-like Rezeptor 9 für eine
pulmonale Entzündungsreaktion durch bakterielle DNA
in einem Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Markus Velten

aus
Bonn

2007

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

Gutachter: Prof. Dr. med. A. Hoeft

Gutachter: Prof. Dr. med Ch. Grohé

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.07.2007

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative
Intensivmedizin, Universitätsklinikum Bonn der Rheinischen Friedrich-
Wilhelms-Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Hoeft

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Widmung

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet, die mich während meines Medizinstudiums jederzeit unterstützt haben und damit einen erfolgreichen Abschluss und diese Doktorarbeit ermöglichten.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	8
1. Einleitung	10
1.1 Akutes Lungenversagen (ARDS).....	10
1.1.1 Definition.....	10
1.1.2 Epidemiologie.....	12
1.1.3 Pathophysiologie.....	14
1.2 Angeborenes Immunsystem und Toll-like Rezeptoren.....	16
1.3 Immunostimulatorische CpG-DNA und Toll-like Rezeptor 9 (TLR9)	19
1.4 Arbeitshypothese.....	23
2. Material und Methoden	24
2.1 TLR9-defiziente Mäuse	24
2.2 Stimulation und Asservierung des Untersuchungsmaterials	24
2.2.1 Einleitung.....	24
2.2.2 Injektionsprotokoll.....	25
2.3 Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	25
2.3.1 Einleitung.....	25
2.3.2 Proteinisolation für EMSA.....	27
2.3.3 Markierung des Oligonucleotids mit γP^{32} -ATP	28
2.3.4 Acrylamidgel.....	29
2.3.5 Bindungsreaktion zwischen NF κ B und dem radioaktiv markierten Oligodesoxynukleotid	30
2.3.6 Gelelektrophorese und Auswertung.....	30
2.4 Ribonuclease Protection Assay (RPA)	31
2.4.1 Einleitung.....	31
2.4.2 RNA – Isolation	32
2.4.3 Durchführung des RPA.....	33
2.4.4 Auswertung.....	36
2.5 Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	36
2.5.1 Proteinisolation für ELISA	36
2.5.2 Durchführung des ELISA	37

2.6	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	38
2.6.1	Einleitung	38
2.6.2	Durchführung der RT-PCR	39
2.7	Bronchoalveoläre Lavage (BAL) nach CpG-DNA Stimulation	39
2.7.1	Einleitung	39
2.7.2	Durchführung BAL	39
2.8	Flow Zytometrie	40
2.8.1	Einleitung	40
4.8.2	Durchführung	40
2.9	Statistik	41
2.9.1	RPA	41
2.9.2	ELISA	41
2.9.3	EMSA	42
2.9.4	RT-PCR	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Klinische Manifestation der Infektion	43
3.2	TLR9-Expression in der Lunge	43
3.3	Pulmonale Aktivierung von MAP Kinasen	43
3.4	Pulmonale NFκB-Aktivierung	44
3.5	Pulmonale Zytokin-mRNA Expression	45
3.6	Proteinkonzentration von Zytokinen im Lungengewebe nach CpG Stimulation	48
3.7	Pulmonale iNOS-mRNA Expression nach CpG-DNA Stimulation	50
3.8	Bronchoalveoläre Lavage (BAL) nach CpG-DNA Stimulation	51
3.9	Pulmonale FACS-Analyse nach CpG-DNA Stimulation	53
4.	Diskussion	55
4.1	Das Mausmodell zur Induktion eines akuten Lungenversagens	55
4.2	Induktion inflammatorischer Mediatoren nach CpG-DNA Stimulation	57
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	58

5.	Zusammenfassung.....	59
6.	Referenzen.....	61
7.	Danksagung.....	68
	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

ARDS	„adult respiratory distress syndrom“
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bichinonsäure
CD	„cluster of differentiation“
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanosin
DC	dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppeltdestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
D-GalN	D-Galaktosamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„Enzym-linked Immunosorbent Assay“
EMSA	„Electrophoretic Mobility Shift Assay“
GACU-Pool	Lösung aus Guanosin, Adenosin, Cytosin und Uracil
GBSS	Gey's balanced salt solution
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	„inhibitory κB kinase“
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthethase
INR	„international normalized ratio“
IRAK	„interleukin-1-receptor-associated-kinase“
JNK	„c-Jun-N-terminal kinase“
LIF	Leukozyten inhibierender Faktor
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MKK6	mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase 6
MODS	„multiple organ dysfunction syndrom“

mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
MyD88	„myloid differentiation marker 88"
NFκB	„nuclear factor κB“
NIK	NFκB „inducing kinase“
NO	Stickstoffmonoxid
ODN	Oligodesoxynukleotid
PAMP	„pathogen associated microbial pattern“
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PRR	„pattern recognition receptor“
RES	retikuloendotheliales System
RNase	Ribonuklease
RPA	„Ribonuklease Protection Assay“
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SIRS	„systemic inflammatory response syndrom“
TAK1	„TGFβ-aktiviert-kinase-1“
TBE	Standardpuffer aus Tris-Borat und EDTA
TIR-Domäne	Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TLR9	Toll-like Rezeptor 9
TLR9-D	TLR9 defizient, „knock-out“
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRAF6	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes-Faktor-6
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
UTP	Uraciltriphosphat
vs	versus
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Akutes Lungenversagen (ARDS)

1.1.1 Definition

Das kritische Krankheitsbild des akuten Lungenversagens wurde erstmalig 1967 beschrieben (Ashbaugh et al., 1967). Bei einer Untersuchung von 284 beatmeten Patienten am Colorado General Hospital und am Denver General Hospital wurde Ashbaugh auf eine Gruppe von 12 Patienten aufmerksam, die sich durch ihre uniformen, pathologischen Befunde von den restlichen Patienten unterschieden. Diese Patienten hatten eine akut aufgetretene, schwere Dyspnoe und eine verminderte respiratorische Compliance. Die Röntgenthoraxaufnahmen wiesen beidseitige diffuse Infiltrationen auf. In den Autopsien wurden pathologische Veränderungen in Form von hyalinen Membranen, Atelektasen, Gefäßzunahme und ein schweres Lungenödem gefunden. Das Auftreten dieser Symptome wurde von Petty et al. später zur differentiendiagnostischen Abgrenzung vom Atemnotsyndrom des Neugeborenen, zunächst als „Adult Respiratory Distress Syndrome“ bezeichnet (Petty und Ashbaugh, 1971).

ARDS:	<ul style="list-style-type: none"> - diffuse bilaterale Infiltrate im Thoraxröntgenbild - schwere, meist therapierefraktäre Hypoxämie vor allem infolge intrapulmonaler Rechts-Links-Shunts - deutlich reduzierte Compliance
-------	---

Tabelle1: Definition ARDS nach (Ashbaugh et al., 1967)

Seit der erstmaligen Beschreibung durch Ashbaugh wurden verschiedenste Bezeichnungen wie Schocklunge, ARDS, „acute lung injury“ (ALI) sowie in der deutschsprachigen Literatur akutes Lungenversagen (ALV) für dieses Krankheitsbild der akuten respiratorischen Insuffizienz verwendet. Ebenso uneinheitlich wie die Terminologie waren auch die Definitionen, die zur Beschreibung und Diagnostik der respiratorischen Insuffizienz verwendet wurden. Dementsprechend schwierig gestaltete sich die Vergleichbarkeit verschiedener Studien und Therapien.

Im Jahre 1992 wurden auf der „American-European Consensus Conference on ARDS“ die unterschiedlichen Namen, pathogenetischen Mechanismen, klinischen Parameter und

Behandlungsempfehlungen diskutiert. Basierend auf dieser Konferenz folgte 1994 die bis heute gültige Definition des „acute respiratory distress syndrome (ARDS)“, wobei es bei vorher lungengesunden Patienten zu einer akuten inflammatorischen Lungenschädigung mit Austritt von Plasmaproteinen in das Interstitium und in den Alveolarraum kommt. Klinisch imponiert ein nicht kardial bedingtes Lungenödem mit Entwicklung einer schweren Hypoxie. Typische radiologische Veränderungen beinhalten neu aufgetretene bilaterale pulmonale Infiltrate. Pathogenetisch liegt eine Störung des alveolären Surfactantsystems sowie eine Erhöhung des pulmonal-vaskulären Widerstandes vor (Bernard et al., 1994; Ware und Matthay, 2000). Typischerweise findet man einen akuten Beginn der Erkrankung mit eingeschränkter Oxygenation, diffuse Verschattungen im ap-Röntgenbild und fehlende Hinweise auf einen erhöhten linksatrialen Druck. Differentialdiagnostische Ursachen wie Atelektasen, Pneumonie, Lungenkontusion, kardiales Lungenödem und Asthma bronchiale sollten bei der Diagnosestellung ausgeschlossen werden. Bedingt durch eine verminderte Compliance der Lunge kommt es zu einem erheblichen Anstieg der Atemarbeit.

Hinsichtlich der Ursache unterscheidet man eine pulmonale von einer nichtpulmonalen Genese, wobei das Lungengewebe stets in stereotyper Weise reagiert (Hudson et al., 1995). Die häufigsten Ursachen für die Entstehung eines ARDS sind Sepsis, Pneumonie, Aspiration, Trauma, Pankreatitis, Massentransfusionen, Rauchgasinhalation und Drogen (Hudson et al., 1995; Ware und Matthay, 2000). Das akute Lungenversagen ist ein zentrales Problem beim multiplen Organdysfunktionssyndrom (MODS) (Bone et al., 1992) und stellt in der Intensivmedizin eine Hauptursache für Morbidität und Mortalität dar (Piantadosi und Schwartz, 2004). Nach den Empfehlungen der Amerikanisch-Europäischen Konsensuskonferenz wird anhand des Schweregrades der Oxygenierungsstörung zwischen einem „acute Lung Injury“ (ALI) mit einer eingeschränkten Oxygenierung ($p_aO_2/F_I O_2 < 300$ mmHg trotz PEEP) und einem „acute respiratory distress Syndrome“ (ARDS) mit stark eingeschränkter Oxygenierung ($p_aO_2/F_I O_2 < 200$ mmHg trotz PEEP) unterschieden (siehe Tabelle 1). Demnach handelt es sich beim ARDS um eine schwerere Verlaufsform des ALI (Schuster, 1995).

ALI:	<ul style="list-style-type: none"> - akuter Beginn - eingeschränkte Oxygenierung ($p_aO_2/F_1O_2 < 300$ mmHg trotz eines positiven endexpiratorischen Drucks (PEEP)) - röntgenologisch: diffuse Verschattungen über beiden Lungen auf dem ap-Röntgenbild - pulmonalkapillärer Verschlussdruck (PC-WP) < 18 mmHg (PCWP nur, wenn gemessen; ansonsten alternativ: fehlender klinischer Anhalt für einen erhöhten linksatrialen Druck).
ARDS:	<ul style="list-style-type: none"> - akuter Beginn - stark eingeschränkte Oxygenierung ($p_aO_2/F_1O_2 < 200$ mmHg trotz eines positiven endexpiratorischen Drucks (PEEP)) - röntgenologisch: diffuse Verschattungen über beiden Lungen auf dem ap-Röntgenbild - pulmonalkapillärer Verschlussdruck (PC-WP) < 18 mmHg (PCWP nur, wenn gemessen; ansonsten alternativ: fehlender klinischer Anhalt für einen erhöhten linksatrialen Druck).

Tabelle 2: Definition ALI / ARDS nach der „American-European Consensus Conference on ARDS“

1.1.2 Epidemiologie

Die zum heutigen Zeitpunkt vorliegenden epidemiologischen Daten zum akuten Lungenversagens sind uneinheitlich, so dass - insbesondere bedingt durch verschiedene Definitionen vor der „American-European Consensus Conference on ARDS“ im Jahr 1994 - eine Beurteilung der Inzidenz schwer fällt. Im Jahre 1972 wurde die Inzidenz des ARDS durch das National Heart and Lung Institute auf 150.000 Fälle pro Jahr in den Vereinigten Staaten geschätzt (U.S.Department of Health and Human Services, 1972).

Nach Einführung der Diagnosekriterien der „American-European Consensus Conference on ARDS“ wurden verschiedene Erhebungen durchgeführt. Im Rahmen des „King County Lung Injury Project“ (KCLIP) an 21 Krankenhäusern in King County, Washington von April 1999 bis Juli 2000 wurden 4251 Patienten auf das Vorliegen eines ARDS untersucht. 1687 der eingeschlossenen Patienten entwickelten die Kriterien eines akuten Lungenversagens, wobei 574 gleichzeitig ein Linksherzversagen aufwiesen und somit definitionsgemäß nicht an einem ALI/ARDS litten. Bei 828 der verbleibenden 1113 Patienten mit einem ALI würde ein

initialer Horowitz-Quotient ≤ 200 mmHG dokumentiert. Dementsprechend wurde eine Inzidenz von 78,9 Fälle/100.000 Lebensjahre für ein ALI bzw. 58,7 Fälle/100.000 Lebensjahre für ein ARDS geschätzt. Zusammenfassend werden eine Inzidenz von 190.000, eine Mortalität von 74.000 und einer Anzahl von 3,6 Millionen Krankenhaustagen pro Jahr in den USA für ein ALI/ARDS angegeben (Rubenfeld et al., 2005). Zu einem vergleichbaren Ergebnis kommt eine 1997 in Skandinavien durchgeführte prospektive Multicenterstudie mit einer Inzidenz des akuten Lungenversagens von 77,6 Fällen/100.000 Lebensjahre und einer Mortalität von 41,0 %. Jedoch lag die Inzidenz des ARDS mit 13,5/100.000 Lebensjahre deutlich niedriger. Hinzu kommt eine eingeschränkte Aussagekraft dieser Studie durch den begrenzten Beobachtungszeitraum von 90 Tagen (Luhr et al., 1999). Eine 2002 in Australien durchgeführte Studie ergab eine Inzidenz für ALI und ARDS von 34 bzw. 22/100.000 Lebensjahren und eine Mortalität von 32% bzw. 38%. Zusätzlich wurde in dieser Untersuchung eine Unterteilung des ARDS in pulmonale und extrapulmonale Ursachen vorgenommen. Häufigste Erkrankung bei den pulmonalen Ursachen war mit 28,6% die Pneumonie und bei den nichtpulmonalen Ursachen mit 34,5% die Sepsis. In der Gesamtheit waren pulmonale und extrapulmonale Erkrankungen annähernd gleichhäufig für die Entstehung eines ALI/ARDS verantwortlich (Bersten et al., 2002).

Auch nach der Festlegung der Richtlinien zur Definition von ALI und ARDS 1994 durch die „American-European Consensus Conference on ARDS“ weichen die Ergebnisse unterschiedlicher Studien weiterhin voneinander ab. Anhand der Tabelle 3 wird deutlich, dass die verschiedenen Studien große Unterschiede hinsichtlich Inzidenz und Mortalität aufweisen. Die Angaben zur Inzidenz liegen tatsächlich zwischen 1,5 bis 75/100.000/Jahr (Garber et al., 1996; Lewandowski et al., 1995; Thomsen und Morris, 1995; Villar und Slutsky, 1989; Ware und Matthay, 2000).

Die falsche Klassifizierung von Patienten kann in den Unterschiedlichen Studien nicht ausgeschlossen werden, dürfte jedoch nach 1994 nicht verantwortlich für die starken Inzidenzunterschiede sein. Demzufolge müssen weitere Ursachen, wie eine regional unterschiedliche Medizinische Versorgung für die starken Schwankungen verantwortlich sein. Dieser Einfluss sollte in internationalen Multicenterstudien überprüft werden (Knaus et al., 1986).

Autor	ALI	ARDS	Mortalität
(Bersten et al., 2002)	34/10 ⁵ /pa	22/10 ⁵ /pa	32% ALI 38% ARDS
(Luhr et al., 1999)	17,9/10 ⁵ /pa	13,5/10 ⁵ /pa	42% (90d)
(Valta et al., 1999)		4,9/10 ⁵ /pa	37% (ICU) 42% (6 Mon.)
(Luce, 1998)		70/10 ⁵ /pa	< 50%
(Reynolds et al., 1998)		10- 14,2/10 ⁵ /pa	36-49%
(Nolan et al., 1997)		7,3- 9,3/10 ⁵ /pa	59%
(Lewandowski et al., 1995)		3- 10/10 ⁵ /pa	50-60%
(Thomsen und Morris, 1995)		4,8- 8,3/10 ⁵ /pa	
(Villar und Slutsky, 1989)		1,5- 3,5/10 ⁵ /pa	70%
(Webster et al., 1988)		4,5/10 ⁵ /pa	
(Fowler et al., 1983)		5,2/10 ⁵ /pa	65%
(U.S.Department of Health and Human Services, 1972)		71/10 ⁵ /pa	50%

Tabelle 3: Studienübersicht

1.1.3 Pathophysiologie

Ein akutes Lungenversagen kann durch pulmonale oder extrapulmonale Ursachen ausgelöst werden. Bei den pulmonalen Ursachen kommt es z.B. durch Pneumonie oder Aspiration zu einer direkten, primären Schädigung des Lungengewebes. Im Gegensatz dazu ist bei den extrapulmonalen Ursachen die Primärerkrankung in einem anderen Organ lokalisiert und führt erst sekundär, indirekt über eine systemische Inflammation zur Lungenschädigung (Ashbaugh et al., 1967; Bernard et al., 1994; Esteban et al., 2004; Katzenstein et al., 1976).

Direkte Lungenschädigung:	Indirekte Lungenschädigung
Pneumonie	Sepsis
Aspiration	Schock
Rauchgas	Massenbluttransfusionen
Thoraxtrauma	Drogenintoxikation
	Pankreatitis

Tabelle 4: ARDS Ursachen, U.S. Department of Health and Human Services

Verschiedene Virulenzfaktoren können eine pulmonale Inflammation auslösen. Das Auftreten und die Dauer eines septischen Schocks sind verknüpft mit der Entstehung eines ARDS (Bernard et al., 1994). Der pathophysiologische Entstehungsweg des akuten Lungenversagens ist im Rahmen eines septischen Geschehens ein multifaktorieller Prozess. Die systemische Antwort auf die bakterielle oder toxische Noxe überschreitet bei einer Sepsis den üblichen Rahmen der physiologischen Abwehr und kann dadurch selbst schädigend wirken. Inflammatorische Mediatoren insbesondere Zytokine werden in diesem Zusammenhang für die Entstehung eines akuten Lungenversagens verantwortlich gemacht (Hudson und Steinberg, 1999; Martin, 1999; McElroy et al., 1995). Die Lunge ist in besonderem Maße den systemischen Entzündungsreaktionen der humoralen und zellulären Abwehrmechanismen ausgesetzt, da sie als kapillärer Filter im Hauptstrom des Blutkreislaufes liegt (Schuster, 2000). Es ist demnach nicht die Noxe selbst, sondern vielmehr die überschießende körpereigene Reaktion, die zur Entstehung des Krankheitsbildes führt.

Schocklunge stellt das morphologische Korrelat des akuten Lungenversagens dar (Böcker, 2000). In Verlauf kommt es zur Destruktion von gesundem Lungewebe. Sauerstoffaufnahme und CO₂-Abgabe, welche bei ausreichender Ventilation von der Diffusionskapazität und vom Ventilations-Perfusions-Verhältnis abhängig sind, nehmen ab. Die alveolokapillare Einheit bestehend aus kapillaren Endothel, Basalmembran, Interstitium, und dem alveolaren Epithel mit Typ I und Typ II Pneumozyten ermöglicht einen effektiven Gasaustausch (Schmidt, 1995). Eine entzündlich bedingte Vergrößerung der Schichtdicke mit einhergehender Reduzierung der gasaustauschenden Oberfläche, wie dies beim ALI/ARDS der Fall ist führt zu einem geringeren Diffusionsstrom und damit zu einer geringeren Sauerstoffaufnahme (Schuster, 2000). In der frühen exsudativen Phase - bedingt durch Nekrosen der Typ-I-Pneumozyten und Endothelzellen der Kapillaren mit Lockerung der „Tight Junctions“ entsteht ein zunächst interstitielles und später proteinreiches alveoläres

Ödem mit den Folgen einer Zunahme des Rechts-Links-Shunts. In der proliferativen Phase kommt es zur Aggregation von neutrophilen Granulozyten und zum Auftreten hyaliner Mikrothromben, als Ausdruck der Endothelschädigung und Kreislaufstörung (Böcker, 2000).

1.2 Angeborenes Immunsystem und Toll-like Rezeptoren

Pathogene Liganden oder andere Fremdmaterialien werden durch das Immunsystem erkannt. Traditionell unterscheidet man eine angeborene/nichtadaptive und eine erworbene Immunantwort. Im Unterschied zum angeborenen zeichnet sich das erworbene Immunsystem durch klonale Proliferation, Spezifität und Gedächtnisfunktion aus und hat sich in der Evolution zu einem späteren Zeitpunkt entwickelt als das angeborene Immunsystem. Dieses komplexe Abwehrsystem findet man nur bei Wirbeltieren. Aufgrund der schnellen Reaktion bei einem erneuten Kontakt mit einem bereits bekannten Pathogen kann der Ausbruch einer Erkrankung verhindert werden. Die erworbene Immunantwort wird durch die Ausschüttung klonaler B- und T-Lymphozyten ausgelöst und zeichnet sich durch seine Spezifität und Gedächtnisfunktion aus. Die Erkennung der Fremdstoffe beruht auf der zufälligen Bildung einer mannigfaltigen Anzahl unterschiedlicher Antigenrezeptoren und anschließender Selektion relevanter Rezeptoren. Diese Mechanismen tragen zur Bildung eines Immunologischen Gedächtnisses bei. Nachteilig hieran ist die Zeitdauer von 4 bis 7 Tagen bis der spezifische Klon in eine Effektorzelle umgewandelt ist (Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002).

Das angeborene Immunsystem wurde bereits 1902 beschrieben (Metchnikoff, 1902), jedoch wurde ihm zunächst nur die Aufgabe zugesprochen eine Infektion so lange einzudämmen, bis das erworbene Immunsystem sich auf den jeweiligen Erreger adaptiert hat. Das erworbene Immunsystem wurde als wichtiger bewertet und wissenschaftliche Untersuchungen konzentrierten sich überwiegend auf dieses. Später fand man jedoch heraus, dass die Aktivierung und Gestaltung des adaptiven Immunsystems durch stimulierende Moleküle und Zytokine ebenfalls zu den Aufgaben des angeborenen Immunsystems zählt (Medzhitov und Janeway, Jr., 1997). Es wird angenommen, dass bis zu 99% aller Infektionen allein durch diese Mechanismen des angeborenen Immunsystems beherrscht werden (Hörner et al., 2004). Im Gegensatz zu den klonalen Rezeptoren der B- und T-Lymphozyten bedient sich das angeborene Immunsystem hierbei einer Gruppe nicht klonaler Mustererkennungsrezeptoren, den so genannten „pattern recognition receptors“ (PRRs). Diese Rezeptoren binden konservierte molekulare Strukturen, die so genannten „pathogen-associated molecular

patterns“ (PAMPs). Bei diesen PAMPs handelt es sich um phylogenetisch konservierte Strukturen, die nicht spezifisch für einen bestimmten Krankheitserreger sind, aber die Unterscheidung zwischen pathogenen und körpereigenen Merkmalen erlauben. PAMPs sind für das Überleben der Mikroorganismen essentielle Strukturen, die nur bei diesen und nicht im Wirt vorkommen. Dazu gehört neben LPS von gramnegativen Bakterien und Lipoteichonsäure von grampositiven Bakterien auch bakterielle DNA (Krieg et al., 1995; Messina et al., 1991).

PRRs, welche der Erkennung von PAMPs dienen, werden in zwei Gruppen unterteilt. Die Gruppe der Scavenger-Rezeptoren, zu denen der Mannose-Rezeptor, das Mannan-bindende Lectin, DEC 205 und das Serum Amyloid Protein gehören, sind für die Phagozytose von Mikroorganismen verantwortlich. Die Zweite Gruppe umfasst die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs), welche Abwehrzellen aktivieren und dadurch eine akute Entzündungsreaktion hervorrufen.

Rezeptor		Ligand	Ursprung des Liganden
TLR1	TLR2- Corezeptor	Triacylierte Lipopeptide Lösliche Faktoren	Bakterien und Mycobakterien <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2		Lipoprotein / Lipopeptide Peptidoglykan Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Phenol-lösliches Modulin Glycoinositolphospholipide Glycolipide Porine Atypisches Lipopolysaccharid Atypisches Lipopolysaccharid Zymosan Sauerstoffradikale β -Defensin High Mobility Group Protein Box 1 Heat-shock Protein 60 Heat-shock Protein 70 Heat-shock Protein gp96	Unterschiedliche Pathogene Gram-positive Bakterien Gram-positive Bakterien Mycobakterien <i>Staphylococcus epidermis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Pilze</i> Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt
TLR3		dsRNA mRNA	Viren Wirt
TLR4		Lipopolysaccharide Taxol Fusionsprotein Hüllproteine Heat-shock Protein 60 Heat-shock Protein 70 Heat-shock Protein gp96 Type III Repeat Domain A des Fibronektins β -Defensin High Mobility Group Protein Box 1 Surfactant Protein A Heparansulfat Fibrinogen	Gram-negative Bakterien Pflanzen Syncytialer Atemwegsvirus Murines Mamacarzinomvirus Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt
TLR5		Flagellin	Gram-negative Bakterien
TLR6	TLR2- Corezeptor	Diacylierte Lipopeptide	Mycobakterien
TLR7		ssRNA ssRNA snRNPs	non-virale und virale ssRNA Wirt Wirt
TLR8		ssRNA ssRNA	non-virale und virale ssRNA Wirt
TLR9		CpG enthaltende DNA	Bakterien
TLR10	Co-Rezeptor?	N.N.	
TLR11			Uropathogenes <i>E.coli</i>
TLR12		N.N.	
TLR13		N.N.	

Tabelle 5: TLR Liganden

Der Name „Toll-artiger Rezeptor“ ist abgeleitet von einem Protein bei *Drosophila melanogaster* namens Toll. Im Embryonalstadium steuert dieses Protein die dorsoventrale Polarität und ist in der adulten Fliege als Bestandteil eines primitiven Immunsystems für die Erkennung von fungalen Proteinen verantwortlich (Anderson et al., 1985b; Anderson et al., 1985a; Hashimoto et al., 1988). Für diese bahnbrechenden Forschungsarbeiten wurde Frau Christiane Nüsslein-Volhard 1995 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Gay und Keith waren die Ersten, die eine auffällige Ähnlichkeit zwischen der intrazellulären Domäne des *Drosophila* TLR und des Interleukin-1 Rezeptors der Säugetiere erkannten (Gay und Keith, 1991). Der Name Toll like Rezeptor wurde gewählt, da TLRs aus Proteinen bestehen, die Toll ähneln, also Toll-artig sind. Bis heute wurden 13 TLRs beschrieben. Hiervon 10 im menschlichen Genom und 12 in der Maus (Beutler et al., 2005; Tabeta et al., 2004). TLRs führen ebenso wie der IL-1 Rezeptor zur Aktivierung von NFkappaB und nutzen hierfür ähnliche Signaltransduktionskaskaden (Medzhitov et al., 1997; Rock et al., 1998). Der am besten charakterisierte Rezeptor ist Toll-like Rezeptor 4 als membranständiger Rezeptor für LPS aus der Zellwand gram-negativer Bakterien (Poltorak et al., 1998). Dabei gehört TLR4 zu einem Rezeptorkomplex aus CD14, TLR4 und MD-2. TLR2 ist der Oberflächenrezeptor für gram-positive Organismen (z. B. *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae*) und deren Zellwandbestandteile (Knuefermann et al., 2004; Lien et al., 1999; Schwandner et al., 1999; Yoshimura et al., 1999), sowie für bakterielle Lipoproteine und Hefe (Aliprantis et al., 1999; Underhill et al., 1999). Erst kürzlich wurden Liganden auch für weitere TLRs identifiziert (Doppelstrang-RNA für TLR3, bakterielles Flagellin für TLR5; bakterielle DNA von sowohl gram-negativen als auch von gram-positiven Bakterien für TLR9) (Alexopoulou et al., 2001; Hayashi et al., 2001; Hemmi et al., 2000). Jedoch besteht weiterhin Forschungsbedarf hinsichtlich der Identifizierung von weiteren spezifischen Liganden, der Aufklärung der intrazellulären Signalkaskade mit den in der Folge induzierten Entzündungsmediatoren und vor allem der Einordnung der Funktion der verschiedenen TLRs in unterschiedlichen Organen bei der Abwehrreaktion einer Infektion, Sepsis oder SIRS.

1.3 Immunostimulatorische CpG-DNA und Toll-like Rezeptor 9 (TLR9)

Bakterielle DNA führt bei Säugern zur Stimulation von Immunzellen (Krieg, 1996). Unwissentlich wurde dies bereits vor über 100 Jahren entdeckt und therapeutisch genutzt. Tokunaga et al. zeigten, dass die antitumorale Aktivität des von William Coley 1892 erstmals verabreichten Coleys Toxin auf bakterielle DNA zurückzuführen ist (Yamamoto et al., 1992).

Prokaryonten und Eukaryonten weisen im Aufbau ihrer DNA Unterschiede auf. Während unmethylierte Cytosin-Phosphat-Guanin-Motive (CpG-Motive) in bakterieller DNA mit einer rechnerisch zu erwartenden Häufigkeit von 1:16 auftreten, findet sich bei der DNA von Wirbeltieren eine CpG-Suppression. Folglich kommen CpG-Motive in eukaryonter DNA viermal seltener vor. Darüber hinaus ist die Mehrheit der CpG-Dinukleotide eukaryonter DNA an der 5. Stelle des Cytosin methyliert, was zu einem Verlust der immunstimulatorischen Potenz führt. Insgesamt sind stimulierende CpG-Motive in prokaryonter DNA 20fach häufiger als in eukaryonter DNA (Schwartz et al., 1997). Für bestimmte synthetische CpG-Oligonukleotide konnte dieser immunstimulatorische Effekt ebenfalls nachgewiesen werden (Hartmann et al., 1999; Sparwasser et al., 1998). Oligonukleotide, die ein Phosphothioat Rückgrat haben, können von Nukleasen nicht abgebaut werden und haben deshalb einen stärkeren stimulierenden Effekt auf das Immunsystem als unveränderte ODN (Krieg et al., 1995).

Bei der Familie der Toll-Like Rezeptoren handelt es sich um transmembranäre Proteine, die zwei charakteristische Domänen besitzen. Eine extrazelluläre leucin-reiche Domäne ist für die Erkennung der PAMPs verantwortlich ist, wohingegen die hoch konservierte intrazelluläre Domäne, welche wegen ihrer Homologie zum IL-1-Rezeptor als Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne bezeichnet wird, und allg. Funktion. Im Gegensatz dazu ist der Toll-like Rezeptor 9 in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Von dort gelangt er durch Fusion mit der Plasmamembran und anschließender Endozytose oder auf direktem Weg durch Fusion von endoplasmatischen Retikulum mit Endosomen ins lysosomale Zellkompartiment (Latz et al., 2004). TLR9 fungiert als primärer Mustererkennungsrezeptor für die Erkennung von bakterieller DNA. Hemmi und Mitarbeiter konnten im Modell der TLR9-defizienten Mäusen ein Ausbleiben der immunstimulatorischen Wirkung von bakterieller DNA bzw. von synthetischen CpG-Oligonukleotiden nachweisen.(Bauer et al., 2001; Hemmi et al., 2000). Auf zellulärer Ebene wird die DNA zunächst – wahrscheinlich durch Klathrin-abhängige Endozytose oder einen bisher nicht identifizierten Korezeptor – internalisiert, um an den Rezeptor zu binden, wird. Der Kontakt zwischen TLR9 und bakterieller DNA findet im lysosomalen Zellkompartiment statt (Ahmad-Nejad et al., 2002). Im Endosom bewirken CpG-Motive die Dimerisierung von zwei Rezeptoren. Dies führt zur Konformationsänderung und zur Rekrutierung von „myloid differentiation marker 88“(MyD88) an die intrazytoplasmatische TIR-Domäne. An der N-terminalen sogenannten „death“-Domäne von MyD88 lagert sich die Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase (IRAK) an und wird durch Autophosphorylierung aktiviert. Im nächsten

Schritt löst sich die IRAK vom Rezeptorkomplex und aktiviert den Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierten-Faktor-6 (TRAF6). Dieser verbindet über „transforming growth factor-activating-kinase-1“ (TAK1) und „transforming growth factor-activating kinase-1 binding protein“ den Rezeptor-assoziierten Komplex mit dem zytoplasmatischen NFκB-Signalosom (Irie et al., 2000). Die Aktivierung von „NFκB-inducing-kinase“ (NIK) und „inhibitory-κB-kinase“ (IKK) führt zur Freisetzung und nukleären Translokation von „nuclear-factor-kappa-B“ (NFκB). Im Zellkern reguliert NFκB die Transkription proinflammatorischer Zytokine, wie TNFα und iNOS (Baeuerle und Baltimore, 1996; Baldwin, Jr., 1996).

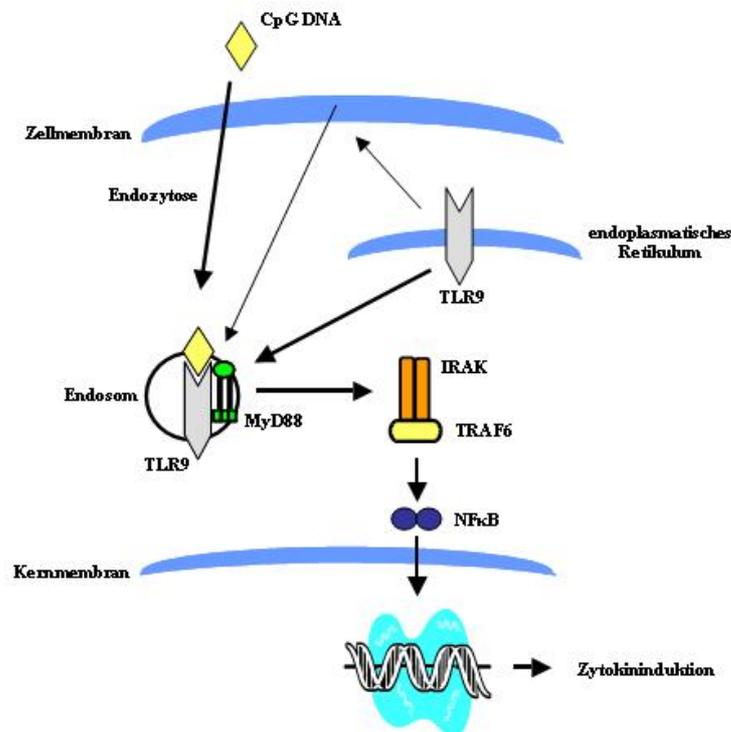


Abbildung 1: Schematische Darstellung der TLR9-Signalkaskade. Bakterielle CpG-DNA wird internalisiert und im Endosom von TLR9 erkannt. Die intrazelluläre Signalkaskade mündet über Aktivierung von MyD88, IRAK und TRAF6 in der nukleären Translokation von NFκB, welcher die Transkriptionsrate proinflammatorischer Zytokine beeinflusst. TLR9 = Toll-like Rezeptor 9, MyD88 = „myloid differentiation marker 88“, IRAK = Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase, TRAF6 = Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes-Faktor-6, NFκB = nukleärer Faktor κB.

Dendritische Zellen, die den TLR9 exprimieren, werden durch bakterielle DNA zur Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-12, TNF α und Interferon- α (IFN α) angeregt. Des Weiteren verhindert CpG-DNA in DC die Apoptose über den „phosphatidylinositide-3-OH-kinase-pathway“ (Park et al., 2002). In der Zellkultur von „bone marrow derived dendritic cells“ (BMDDC) bewirkt die Stimulation mit CpG-DNA eine erhöhte Expression vom Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II), welcher eine erhöhte Antigen-präsentierende Kapazität bewirkt (Sparwasser et al., 1998). Dies und die Eigenschaft von DC nach Aktivierung in Lymphknoten einzuwandern, verdeutlicht ihre Bedeutung bei der Verknüpfung von angeborener und erworbener Immunität.

Bakterielle DNA und CpG-ODN sind starke Aktivatoren von B-Lymphozyten in allen Vertebraten. CpG-Motive führen dazu, dass B-Lymphozyten in den Zellzyklus eintreten, sich teilen und antiapoptotisch wirksame Gene exprimieren (Yi et al., 1998; Yi et al., 1996). B-Zellen exprimieren verstärkt MHC II, kostimulatorische Moleküle wie CD 80 und CD 40 und sezernieren IL-6, das für die Produktion von IgM benötigt wird, und IL-10, das als antiinflammatorisches Zytokin die überschießende Bildung von IL-12 verhindert (Takenaka et al., 1997).

CpG-DNA führt in murinen Makrophagen und Monozyten zur nukleären Translokation von NF κ B (Stacey et al., 1996) und zur Produktion von TNF α (Sparwasser et al., 1998). Humane Monozyten werden nur in Anwesenheit von DC aktiviert (Hartmann und Krieg, 1999; Hornung et al., 2002; Kadowaki et al., 2001).

Neutrophile Granulozyten besitzen den TLR9 nicht (Hornung et al., 2002), wandern aber, angezogen von einer durch CpG-DNA hervorgerufenen Entzündung, im Sinne einer Chemotaxis in das betroffene Gewebe ein und verstärken so das Abwehrsystem in der Bekämpfung von Mikroorganismen (Weighardt et al., 2000).

Natürliche Killer-Zellen und T-Lymphozyten tragen zwar den TLR9 auf den Membranen des endoplasmatischen Retikulums, können aber nicht direkt durch CpG-DNA aktiviert werden. Nur wenn gleichzeitig Monozyten anwesend sind, produzieren NK-Zellen Interferon- γ (IFN γ), welches die Antikörper Produktion in B-Lymphozyten reguliert.

In der klassischen Vorstellung der TLRs als Teil des angeborenen Immunsystems bewirkt die Aktivierung des Immunsystems durch bakterielle DNA die Bekämpfung einer Infektion. Dadurch eröffnen sich vielfältige – zurzeit noch experimentelle – therapeutische Möglichkeiten vor allem als Adjuvanz in Impfstoffen (Roman et al., 1997) oder als immunostimulatorische Substanz zur Überwindung der Immunparalyse im Rahmen der Sepsis (Weighardt et al., 2000).

1.4 Arbeitshypothese

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, ob bakterielle DNA bzw. synthetische CpG-Oligonukleotide über einen TLR9-abhängigen Mechanismus zu einer Zytokininduktion in der Lunge führen und eine akute pulmonale Entzündungsreaktion hervorrufen.

2. Material und Methoden

2.1 TLR9-defiziente Mäuse

In dieser Studie wurden altersentsprechende (8-12 Wochen) Wildtyp (WT) (C57BL/6, Charles River Laboratories) Mäuse und Toll-like Rezeptor 9 defiziente (TLR9-D) Mäuse, welche freundlicherweise von Professor Shizuo Akira, Department of Host Defense, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Die defizienten Mäuse wurden durch homologe Rekombination an embryonalen Stammzellen von C57BL/6 Mäusen hergestellt (Hemmi et al., 2000). Der Nachweis der Homozygotie erfolgte mittels spezifischer PCR Primer. Der Primer „wild-type“ (5'-GAA GGT TCT GGG CTC AAT GGT CAT GTG-3') war spezifisch für das unveränderte Gen für TLR9. Der Primer „neo1500“ mit der Sequenz 5'-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG-3' war spezifisch für das TLR9 Gen, in das eine Neomycin-Resistenz-Kassette eingebaut war und das Genprodukt unbrauchbar macht. Die Bindungsstelle für den Primer „extra“ lag außerhalb des veränderten Bereiches. Dieser Primer war verantwortlich für die DNA Amplifikation in entgegengesetzter Richtung zu „wild-typ“ und „neo1500“ und hatte die Sequenz 5'-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG-3'.

Zur Unterbringung der Mäuse standen separate, vollklimatisierte Räume im Tierstall des „Hauses für experimentelle Therapie“ der Universitätsklinik Bonn zur Verfügung. Die Tiere erhielten freien Zugang zu Wasser und Standardtierfutter. Ein Tierversuchsantrag durch die Bezirksregierung Köln genehmigt (Aktenzeichen 50.203.2 - BN 43, 28/01).

2.2 Stimulation und Asservierung des Untersuchungsmaterials

2.2.1 Einleitung

TLR9 ist für die Erkennung von bakterieller DNA bzw. deren Fragmente an Hand von nicht methylierten CpG-Motiven verantwortlich (Bauer et al., 2001; Hemmi et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde den Mäusen ein synthetisches CpG-Oligonukleotid (ODN) injiziert, das ein stabilisierendes Phosphothioat-Rückgrat enthielt (CpG-B). Es handelt sich

um 1668-Thioat (Oligonukleotid 500 nmol, Tib MolBiol, Berlin, Deutschland) mit einer Fragmentlänge von 20 Basenpaaren und folgender Sequenz: 5' – TCCATGACGTTCCCTGATGCT – 3' (Krieg et al., 1995). Die Messung der Zytokinproduktion erfolgte zu den Zeitpunkten null, ein, zwei, vier und sechs Stunden nach Stimulation an Wildtyp (WT)- und TLR9 defizienten bzw. „knockout“ (KO)-Mäusen, also in insgesamt zehn Gruppen. Den Mäusen der Gruppe 0h WT und 0h KO wurde kein CpG-ODN injiziert, sie dienten als Kontrollgruppe.

2.2.2 Injektionsprotokoll

Da CpG-ODN bei der ersten Leberpassage inaktiviert würde, musste bei den Versuchstieren zunächst die Leberfunktion geschwächt werden. Dies erreichte man durch die Injektion von 200 µl einer 0,01 g/l D-Galaktosamin-Lösung (DGal) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) intraperitoneal. Diese Schwächung der Leberfunktion führte bei den Mäusen zu einer größeren Empfindlichkeit für die nachfolgende Behandlung mit Thioat. Eine halbe Stunde nach der ersten Injektion folgte eine weitere, ebenfalls intraperitoneale Injektion, mit 20 nmol 1668-Thioat in 200 µl Wasser ad injectabile (Braun, Melsungen, Deutschland). Die im Anschluss, zu den festgelegten Zeitpunkten nach Injektion, durchgeführte Euthanasie der Mäuse erfolgte durch atlanto-okkzipitale Dislokation.

Mittels chirurgischer Schere und Pinzette wurden die Mäuse knapp unterhalb des knöchernen Thorax quer von einer Seite zur anderen (mittlere Axillarlinie) laparotomiert. Entlang der Axillarlinien wurde der Thorax bis zur Axilla geöffnet. Nach Durchtrennung des Diaphragmas wurde die vordere Thoraxwand nach kranial geklappt. Man hatte nun freie Sicht auf Herz, Lunge und Leber. Diese Organe wurden herauspräpariert, in 4 °C kaltem PBS (0,58 M Na₂HPO₄, 0,17 M NaH₂PO₄, 0,68 M NaCl, pH 7,3 Merck, Darmstadt, Deutschland) gewaschen und in flüssigem Stickstoff (Linde, Köln, Deutschland) tiefgefroren. Die so gewonnenen Gewebeproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei –80 °C konserviert.

2.3 Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

2.3.1 Einleitung

Der „Electrophoretic mobility Shift Assay“ (EMSA), ist eine direkte und sensitive Technik zur Untersuchung der sequenzspezifischen Bindung von Transkriptionsfaktoren an

doppelsträngige DNA. Diese Faktoren binden an spezifische DNA Sequenzen und spielen eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsregulation von Genen. Derzeit sind 27 Gruppen von Transkriptionsfaktoren, mit einer unterschiedlichen Anzahl von Mitgliedern, bekannt. Manche dieser Faktoren können direkt an die für sie spezifische DNA Region binden. Andere bedürfen einer vorherigen Aktivierung durch Phosphorylierung oder die Bindung von Homodimeren zu Heterodimeren. Die Kenntnis darüber, welche Transkriptionsfaktoren die Genregulation beeinflussen können, ermöglicht ein besseres Verständnis komplexer Vorgänge der Entwicklung und des Immunsystems. Für den EMSA müssen doppelsträngige DNA Oligonukleotide am 5'OH Ende, durch die spezifische polynucleotid kinase, mit radioaktivem Phosphor markiert werden. Bei der jeweiligen DNA Sequenz handelt es sich um das für den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor spezifische Oligonukleotid. Das radioaktiv markierte Oligonukleotid wird mit der nukleären Proteinfraction der zu untersuchenden Zellen inkubiert, so dass die im nukleären Extrakt zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren an das Oligonukleotid binden können. Aufgrund der unterschiedlichen Molekülgröße wandert der so entstandene Komplex in der Gelelektrophorese langsamer als ungebundene Proteine und es kommt zu Ausbildung spezifischer Banden, die nach oben verschoben sind. Daher rührt der Name „band shift assay“.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte mit dieser Methode der qualitative Nachweis auf „nuklear factor κB “ (NF κB). NF κB ist ein Transkriptionsfaktor, der in seiner inaktiven Form komplexiert mit „inhibitory κB “ (I κB) im Zytoplasma vorliegt. Durch einen geeigneten Stimulus, z. B. LPS, bakterielle DNA, TNF α , Wasserstoffperoxid oder ultraviolette Strahlung wird I κB phosphoryliert und NF κB wird freigesetzt, welches dann in den Zellkern diffundieren kann. Im Zellkern ist NF κB in der Lage an verschiedene DNA-Sequenzen zu binden und so die Transkription unterschiedliche Gene zu initiieren und zu verstärken. Je nach Zelltyp wird die Expression der Gene für Zytokine und Wachstumsfaktoren (IL-1 β , IL-6 und TNF α), Chemokine (iNOS, Komplementfaktoren und Cyclooxygenasen), Immunorezeptoren, Leukozyten und immunregulierende Proteine (MHC-I, T-Zell-Rezeptor und leichte κ -Kette von Immunglobulinen) gesteuert. Dabei ist die Nukleotidsequenz, an die sich NF κB anlagert, nicht immer genau identisch. Die Konsensus-Sequenz 5'-GGG RNN YYC C -3' fasst die möglichen Bindungsstellen zusammen. In dieser allgemeingültigen Formel stehen die Buchstaben R für die Basen Adenin und Cytosin, Y für die Basen Thymin oder Cytosin und N für eine beliebige Base.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Oligonukleotid mit folgender Sequenz benutzt: 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' (double-stranded DNA for Gel Shift, Santa Cruz

Biotechnology, Ca, USA). Dieses Oligonukleotid wurde mit γ -Phosphor³²-ATP radioaktiv markiert und mit der nukleären Fraktion der Proteine aus Mäuselungen inkubiert. In den Proben vorhandenes NF κ B lagerte sich an die spezifische Bindungsstelle an und konnte in einer Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde nur ein Experiment mit jeweils einer WT-Maus und einer KO-Maus zu den Zeitpunkten null, eine, zwei und sechs Stunden nach Injektion von DGal und 1668-Thioat durchgeführt.

2.3.2 Proteinisolation für EMSA

Zum Nachweis von aktiviertem NF κ B, über die sequenzspezifische Bindung an radioaktiv markierter DNA, durch den EMSA, muss vorher die Isolation der nukleären Proteine erfolgen. Zur Gewinnung dieser, wurde in der vorliegenden Arbeit die Proteinisolation aus Mäuselungen mit dem NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Pierce) durchgeführt. Um die sequenzspezifische DNA-Bindung zu gewährleisten, muss die Quartärstruktur der Proteine während der Isolation erhalten bleiben. Deshalb wurde während des Versuches größtmöglicher Wert auf die Kühlung der Proben gelegt.

Zur Vorbereitung der Isolation wurden Mörser und Pistill auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt, die Proben aus dem $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ Eisschrank in flüssigen Stickstoff überführt und die Zentrifuge (3K18, Sigma) auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Während des gesamten Versuches erfolgte die Lagerung von Mörser und Pistill in Trockeneis, um diese zu kühlen. Für jede Probe wurden drei 1,5 ml Plastikröhrchen beschriftet und in den Deckel jedes Röhrchens mit einer Nadel ein kleines Loch gestochen. Dies verhinderte, dass die Röhrchen durch entstandenen Druck bei großen Temperaturschwankungen plötzlich aufsprangen und Probe verloren ging.

Nachdem alle Materialien eisgekühlt waren, wurde eine Mäuselunge mit etwas flüssigem Stickstoff in den Mörser gegeben. Mit vorsichtigen Stößen wurde das Organ zunächst in kleinere Stücke zerteilt, um dann unter Zugabe von weiterem Stickstoff zu einem feinen trockenen Pulver verrieben zu werden. Dieses wurde mit einem eiskalten Spatel zusammengekratzt und in ein vorgekühltes 1,5 ml Plastikröhrchen überführt.

Im NE-PER-Kit sind die Reagenzien Cytoplasmic Extraction Reagent I + II (CER I + II) und das Nuclear Extraction Reagent (NER) enthalten. Das benötigte Volumen richtete sich nach der Menge zerriebenen Gewebes. Auf 100 mg Gewebe wurden 500 μl CER I (1:5), 27,5 μl CER II (3,63:1) und 250 μl NER (1:2,5) benötigt. Um den Abbau von Protein durch Proteinasen zu vermeiden, wurde den Lösungen CER I und NER Proteaseinhibitoren (alle von Sigma) entsprechend folgender Tabelle zugesetzt.

Proteaseinhibitor	[CER I]	[NER]
Benzamidine	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml
Aprotinin	2 µl/ml	2 µl/ml
Leupeptin	2 µl/ml	2 µl/ml
PMSF (Phenylmethylsulfonyl Flouride)	0,75 mM	2 mM

Tabelle 6: Konzentration der Proteaseinhibitoren in den Lösungen CER I und NER

Nachdem die Lösungen vorbereitet waren, wurde CER I entsprechend dem Gewicht der Probe in die Plastikröhrchen pipettiert. Diese wurden dann mit einem Vortex Genie auf höchster Stufe gemischt und anschließend für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Als nächstes wurde das, nach dem Gewicht der Probe berechnete, Volumen CER II in das Reaktionsgefäß gegeben. Wiederum wurde das Reaktionsgemisch mit dem Vortex Genie gemischt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von einer Minute wurden die Plastikröhrchen noch einmal geschüttelt und schließlich fünf Minuten bei 13.000 U/m und 4 °C zentrifugiert (3K18, Sigma). Der resultierende Überstand entsprach der zytoplasmatischen Proteinfraction und wurde in ein neues Plastikröhrchen überführt und auf Eis gestellt. Das Pellet am Boden des ersten Plastikröhrchens enthielt die Kerne der lysierten Zellen. Diese wurden nun durch Zugabe des errechneten Volumens NER lysiert. Zur Resuspendierung des Pellet im NER musste das Tube sorgfältig mit einem Vortex Genie auf höchster Stufe gemischt werden. Die Inkubationszeit auf Eis betrug 40 Minuten. Innerhalb dieses Zeitraumes wurden Röhrchen alle 10 Minuten geschüttelt. Im Anschluss daran erfolgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 13.000 U/m und 4 °C. Der resultierende Überstand entsprach der nukleären Proteinfraction und wurde in neue Plastikröhrchen überführt und auf Eis gestellt.

Der Erfolg der Isolation wurde durch Proteinkonzentrationsmessung mit einem BCA-Kit (Pierce) überprüft (siehe 2.5.1 Proteinisolation ELISA).

2.3.3 Markierung des Oligonukleotids mit $\gamma\text{P}^{32}\text{-ATP}$

Der erste Schritt des EMSA bestand in der Markierung des, für das gesuchte NFκB komplementären Oligonukleotids, mit radioaktivem $\gamma\text{-P}^{32}\text{-ATP}$ zur Herstellung der „hot probe“. Hierfür pipettierte und vermischte man nacheinander 12,75 µl ddH₂O, 5 µl 2,5 X „Forward Reaction Buffer“ (Gibco), 3,73 µl (5 pmol) NFκB-Konsensus-Sequenz-

Oligonukleotid (Santa Cruz), 2,5 μl γP^{32} -ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 3000 Ci/mmol, Amersham) und 1 μl (10 units) T4 Polynukleotidkinase (Gibco) in einem 1,5 ml Plastikröhrchen. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation des Reaktionsgemisches bei einem für die Reaktion spezifischen Temperaturoptimum von 37 °C für 20 Minuten in einem Heizblock (Thermomixer comfort, Eppendorf). Der nächste Schritt bestand darin, durch das Anheben der Temperatur für 15 Minuten auf 65 °C, die Reaktion zum Abbruch zu bringen. Währenddessen wurden zwei Chromatographiesäulen (Micro Bio-Spin[®] 6 Chromatography Columns, Bio-Rad) für zwei Minuten bei 3400 U/m zentrifugiert. Bedingt durch die Flugkraft presste sich die Flüssigkeit in dem Röhrchen durch einen Filter und bereitete diesen für den nächsten Schritt vor. Das Plastikröhrchen mit der durch den Filter zentrifugierten Flüssigkeit wurde verworfen und durch ein neues 1,5 ml Plastikröhrchen ersetzt. Nun erfolgte das Überführen des Reaktionsgemisches aus dem Röhrchen im Heizblock in die Chromatographiesäule. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch Zentrifugation mit 3400 U/m durch den Filter der Chromatographiesäule gepresst. Das Effluat enthielt das radioaktiv markierte Oligonukleotid; die „hot probe“.

Zur Aktivitätsbestimmung der „hot probe“ wurden 1 μl derselben mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, PerkinElmer) vermischt und von einem Szintillationszähler (LS 6000 IC, Beckman) ausgemessen. Die durchschnittliche Aktivität der Probe lag bei 80.000 Cherenkov counts/ μl bei einem akzeptablen Minimum von 50.000 Cherenkov counts / μl .

Die „hot probe“ wurde in einem abschirmenden Plexiglasbehälter bei -20° C aufbewahrt und konnte bei ausreichender Menge und Aktivität für weitere Versuche innerhalb von 14 Tagen wieder verwendet werden.

2.3.4 Acrylamidgel

Zur Herstellung der für den EMSA benötigten Acrylamidgele verwendeten wir den BIO-RAD (Produkt noch suchen). Zunächst erfolgten eine gründliche Reinigung der Glasplatten mit ddH₂O, sowie mit Methanol und das Trocknen durch Abreiben mit KimWipes. Im Anschluss wurde die kleinere der beiden Glasplatten mit 500 μl SigmaCode (Sigma) silikonisiert, um am Ende des Versuches ein besseres Ablösen der kleineren Glasplatte vom Gel zu ermöglichen. Um die Mulden beim Beladen des Gels besser zu erkennen, wurden diese mit Filzstift markiert und nummeriert. Anschließend wurden die Glasplatten mit an den Seiten befindlichen Abstandshaltern und einem Kamm, welcher zur Herstellung der Mulden diente, in Klammern fixiert und in die Gießvorrichtung gespannt. Mit einer Wasserwaage konnte die

Gießvorrichtung genau ausgerichtet werden. Zur Herstellung des Gels wurden 6,75 ml 30 % Acrylamid (National Diagnostics), 6,75 ml 30 % Acrylamid (National Diagnostics), 2,5 ml 50 % Glycerol (Merck) und 2,5 ml 5 X TBE-Puffer (8,9 M Tris, 8,9 M Borsäure, 200 mM EDTA, pH 8,3 Merck) in ein 50 ml Tube pipetiert, gut vermischt und mit ddH₂O auf 50 ml aufgefüllt. Um die Polymerisation der Flüssigkeit zum Gel zu bewirken, erfolgte die Zugabe von 150 µl 30% Amoniumpersulfat (Bio-Rad) und 75 µl TEMED (Bio-Rad). Hiernach musste die Flüssigkeit zügig, mittels einer 10 ml Glaspipette, in die Kammer pipetiert werden. Die Gele wurden in Frischhaltefolie verpackt und für 4 – 24 Stunden bei + 4° C gelagert.

2.3.5 Bindungsreaktion zwischen NFκB und dem radioaktiv markierten Oligdesoxynukleotid

Nach der Synthese der „hot probe“ folgte die Bindungsreaktion zwischen dem nukleären Proteinextrakt und dem radioaktiv markierten Oligonukleotid. Dazu wurden zunächst die zu untersuchenden Proben langsam auf Eis aufgetaut. An Hand der photometrisch bestimmten Protein-Konzentration konnte das Volumen der Probe ausgerechnet werden, das 20 µg nukleäre Proteine enthielt. Dieses Volumen wurde in neue Plastikröhrchen überführt und mit ddH₂O zu einem Gesamtvolumen von 17 µl aufgefüllt. Zu jedem Plastikröhrchen wurden 7 µl eines Gemisches aus Poly(dI-dC) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) und 5 X „Binding Buffer“ (60 mM Hepes, 20 mM Tris, 300 mM KCL, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 50 % Glycerol, pH 7,9) pipetiert. Das Gemisch bestand aus 1 µg/µl Poly(dI-dC) und 5 X „Binding Buffer“ im Verhältnis von 2:5. Zuletzt wurde 1 µl „hot probe“ in jedes Plastikröhrchen pipetiert, so dass ein Gesamtvolumen von 25 µl entstand. Zur Bindung von NFκB aus den Proben an das radioaktiv markierte Oligonukleotid wurden die Plastikröhrchen bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert.

2.3.6 Gelelektrophorese und Auswertung

Am nächsten Tag wurden die Gele in die Elektrophorese-Maschine gestellt und die Kammern mit 1 X TBE (1,78 M Tris, 1,78 M Borsäure, 40 mM EDTA, pH 8,3 Merck) als Laufpuffer gefüllt. Bevor das Gel beladen wurde, wurde es durch ein Vorlauf von 30 Minuten bei 90 V vorgewärmt. Anschließend wurden die Proben in die Gelmulden geladen. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proben wurde zunächst für 30 Minuten eine Spannung von 100 V, dann für weitere 150 Minuten eine Spannung von 160 V angelegt. Sobald das Gel

zu Ende gelaufen war, wurde es mit Hilfe eines gleich großen Filterpapiers aus der Elektrophoresekammer genommen, mit Polyvinylchlorid-Folie bedeckt, in einem Gel-Trockner (Vacuum Gel Dryer Model 583, BioRad, München, Deutschland) bei 70 °C getrocknet und mit dem Filterpapier verbacken. Um die radioaktiv markierten Komplexe aus NFκB und Oligonukleotid sichtbar zu machen, wurde von dem so fixierten Gel eine Autoradiographie auf Röntgenfilm angefertigt.

2.4 Ribonuclease Protection Assay (RPA)

2.4.1 Einleitung

Der „Ribonuclease Protection Assay“ (RPA) ist eine sensitive und schnelle Methode, um spezifische mRNA-Transkripte zu identifizieren und zu quantifizieren. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Adaptierung des „S1 nuclease assays“, wobei RNA-Sonden an Stelle von DNA-Sonden genutzt werden und die S1-Nuklease durch eine einzelstrang-spezifische Ribonuklease (Rnase) ersetzt wird, da die Behandlung von RNA:RNA Doppelsträngen mit Ribonuklease reproduzierbarer ist als die Behandlung von RNA:DNA Hybrid-Doppelsträngen mit S1-Nuklease. Der „S1 nuclease assay“ und der RPA sind robuste, praktisch austauschbare Techniken, um das Vorhandensein und die Struktur von mRNA-Transkripten zu untersuchen. „Solution hybridization assays“, so wie RPA und „S1 nuclease assay“, besitzen eine höhere Sensitivität als Hybridisations-Protokolle, die auf „RNA bound to a soil“ basieren, so wie Northern Blot und Dot Blot. Außerdem bieten Northern Blot und Dot Blot nur die Möglichkeit ein Transkript zu untersuchen, während beim RPA mehrere Proben und Transkripte in einer einzigen Reaktion untersucht werden können, soweit sich die Größe der geschützten Transkripte signifikant voneinander unterscheidet.

Den Beginn des Versuchs stellt die Hybridisierung der RNA-haltigen Proben mit einer im Überschuss zugegebenen einzelsträngigen antisense-mRNA-Sonde dar. Nach der Hybridisierung werden überschüssige, nicht gebundene oder nicht zu den Zielsequenzen homologe mRNA-Sonden genauso wie nicht gebundene Proben RNA-Sequenzen durch Zugabe einer einzelstrang-spezifischen Ribonuklease, gewöhnlich RNaseA, RNaseT1 oder RNase1, verdaut. Die Ribonuklease wird daraufhin inaktiviert und extrahiert, und die Sonde: Target-Hybriden werden durch denaturierende Polyacrylamid-Urea-Gelelektrophorese

aufgetrennt. Für die Darstellung und Quantifizierung der Ergebnisse wird das Gel einem Phosphorimager-Screen und einem Röntgenfilm exponiert.

2.4.2 RNA – Isolation

Alle Schritte dieses Versuches wurden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt, um eine Degradierung der gewonnenen RNA zu verhindern. Zunächst wurden in jedes 15 ml Probenröhrchen (Sarsteadt, Nümbrecht, Deutschland) 3 ml Trizol Lösung (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) gegeben. Anschließend wurden die Lungen aus dem –80 °C kalten Tiefkühlschrank in diese Röhrchen überführt und mit dem Gewebehomogenisator (Ultra-Turrax TP 18-10 Janke & Kunkel KG, Stauffen im Breisgau, Deutschland) zerkleinert, bis keine groben Stücke mehr zu erkennen waren. Nach der Verarbeitung einer jeden Lunge wurde der Homogenisator durch Spülen mit 4 M GIT Lösung aus Guanidine (Sigma, Steinheim, Deutschland) und zweimaligem Spülen mit 0,1%iger Lösung DEPC-Wasser (Sigma) von Geweberesten befreit. Nach 10 Minuten Inkubation in Trizol wurde 600 µl Chloroform (Merck) zu den zerkleinerten Lungen gegeben. Nach kurzer Durchmischung mittels eines Vortex Genie (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) und weiteren 10 Minuten Inkubation wurden die Proben bei 4000 U/min und 4 °C 30 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge CPKR, Beckman Instruments GmbH, München, Deutschland). Es bildeten sich drei Phasen. Die oberste Phase, klar bis gelblich, enthielt die RNA und wurde jeweils vorsichtig abpipettiert und in neue 15 ml Probenröhrchen überführt. Die beiden übrigen Phasen wurden dekantiert.

Um die RNA auszufällen, wurde 1,5 ml Isopropanol (Merck) hinzugegeben, durchmischt und 30 Minuten auf –80 °C gekühlt. Anschließend wurden die Proben unter denselben Bedingungen wie zuvor zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation hatte sich ein Pellet gebildet, das nun mit 75 % Ethanol (Merck) gewaschen wurde. Nach weiteren 20 Minuten Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurde das Pellet luftgetrocknet. Danach wurde es in 200 µl DEPC-Wasser aufgenommen und mit einem Photometer die Extinktion bei 260 nm bestimmt. Mit Hilfe des „Lambert-Beer'schen Gesetzes“ konnte nun die Konzentration der gewonnenen RNA errechnet werden. Zuletzt wurden von jeder Probe zwei Aliquots mit je 100 µl in 1,5 ml RNase freien Plastikröhrchen (Eppendorf, Wesseling, Deutschland) bis zum weiteren Gebrauch bei –80 °C tiefgefroren.

2.4.3 Durchführung des RPA

Der RPA lief in vier Schritten ab:

- Synthese der antisense-mRNA-Sonden aus der cDNA,
- Vorbereitung der RNA-Proben der Versuchstiere und Hybridisation,
- RNase-Verdau von nicht hybridisierten RNA-Strängen und RNA-Überhängen oder RNA-Loops und
- Herstellung des Polyacrylamid-Urea-Gels und die Gelelektrophorese

1.) Zur Synthese der antisense-mRNA-Sonde wurde ein speziell von BD Bioscience angefertigtes „multi-probe template set“ verwendet. Es enthielt die cDNA der Zytokine IL-12p35, IL-12p40, TNF α , IL-1 α , IL-1 β , LIF, IL-6 und IFN γ . Außerdem enthielt das Template die cDNA der „housekeeping genes“ L32 und GAPDH.

Die zur Transkription benötigten Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut und in der folgenden Reihenfolge in ein 1,5 ml Plastikröhrchen (Eppendorf) pipettiert: 1 μ l RNasin, 1 μ l GACU Pool, 2 μ l DTT, 4 μ l 5 X Transkriptionspuffer (In Vitro Transcription Kit, Pharmingen, San Diego, CA, USA), 1 μ l Template cDNA (customized multi-probe template set, Pharmingen), 10 μ l [α -³²P]-UTP (9,25 Mbq / 250 μ Ci[α -³²P] UTP (Amersham, Braunschweig, Deutschland) und 1 μ l T7-RNA-Polymerase (Pharmingen). Dieses Reaktionsgemisch wurde zur Transkription der Template-cDNA in radioaktiv markierte antisense-mRNA-Sonden für 90 Minuten auf 37 °C inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf, Wesseling, Deutschland). Die Transkription wurde durch eine 30-minütige Inkubation mit 2 μ l DNase (Pharmingen) gestoppt. Danach wurden zur Enzymextraktion 26 μ l 20 mM EDTA (Pharmingen), 25 μ l Citrat-gepuffertes Phenol (Appllichem, Darmstadt, Deutschland), 25 μ l Chloroform: Isoamylalkohol 50:1 (Merck) und 2 μ l Hefe-tRNA (Pharmingen) zugegeben. Nach Zentrifugation (Biofuge pico, Heraeus instruments, Langenselbold, Deutschland) wurde der RNA-haltige, klare Überstand in ein neues 1,5 ml Plastikröhrchen überführt und erneut mit 50 μ l Chloroform:Isoamylalkohol gewaschen.

Nach Überführung des Überstandes in ein drittes Plastikröhrchen wurden 50 μ l 4 M Ammoniumazetat (Pharmingen) und 250 μ l 100 % Ethanol (Merck) zugesetzt. In dieser Lösung wurde die antisense-mRNA auf -80 °C für mindestens 30 Minuten präzipitiert und dann zu einem Pellet zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 90 % Ethanol (Merck) gewaschen und dann für 10 Minuten luftgetrocknet. Die antisense-mRNA wurde in 30 μ l Hybridisationspuffer (Pharmingen) gelöst. Die Überprüfung der Transkription erfolgte, indem 1 μ l der RNA-Lösung in ein Plastikröhrchen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold,

PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau - Jügesheim, Deutschland) gegeben wurde und in einem Szintillationszähler (LS 6000 IC, Beckman, Fullerton, CA, USA) gemessen wurde. Zu erwarten war ein Maximum von 3×10^6 Cherenkov counts/ μl mit einem akzeptablen Minimum von 3×10^5 counts/ μl .

2.) Ein Aliquot jeder RNA-Probe wurde auf Eis aufgetaut. An Hand der photometrisch bestimmten RNA-Konzentration konnte das Volumen der Probe ausgerechnet werden, das 20 ng RNA enthielt. Dieses Volumen wurde in neue Plastikröhrchen überführt, welche dann solange in einer SpeedVac (Savant Instruments Inc., Holbrook, NY, USA) zentrifugiert wurden, bis die Flüssigkeit verdunstet und die RNA als Pellet sichtbar war. Die so getrockneten RNA-Proben wurden in 8 μl Hybridisationspuffer gelöst. Von der radioaktiv markierten antisense-mRNA-Sonde wurden 2 μl zu jeder Probe gegeben. Ein Tropfen innerten Mineralöls (Sigma, Steinheim, Deutschland) verschloss jeweils das Reaktionsgemisch. Die Proben wurden in einem Heizblock für 5 Minuten auf 90 °C erhitzt. Der Heizblock wurde zur Hybridisierung der Proben-RNA:antisense-mRNA langsam um 1 °C pro Minute auf 56 °C abgekühlt und über Nacht auf dieser Temperatur belassen.

3.) Vor der RNase-Behandlung wurden die Proben auf eine Temperatur von 30 °C gebracht. In der RNase-Behandlung wurden die hybridisierten RNA-Proben mit 100 μl RNase-Cocktail bestehend aus RNase-Puffer:RNase A + T-Mix (RPA KIT Pharmingen) im Verhältnis 417:1 (2,5 ml RNase-Puffer und 6 μl RNase A + T-Mix für 20 Proben) für 90 Minuten auf 30 °C inkubiert.

Bevor der RNase-Verdau abgeschlossen war, wurde ein Proteinase-Cocktail bestehend aus Proteinase-Puffer, Proteinase K und Hefe-tRNA (Pharmingen) im Verhältnis 13:1:1 vorbereitet (390 μl Proteinase-Puffer, 30 μl Proteinase K und 30 μl Hefe-tRNA für 20 Proben). Von diesem Gemisch wurden jeweils 18 μl in der Anzahl der Proben entsprechende neue Plastikröhrchen aliquotiert. Der RNase-Verdau wurde unter der Ölphase herauspipettiert und mit der Proteinase K auf 37 °C für 15 Minuten inkubiert, wodurch die RNase inaktiviert wurde. Mit 65 μl Citrat-gepuffertes Phenol und 65 μl Chloroform:Isoamylalkohol 50:1 wurden die RNase sowie die Proteinase K extrahiert. Nach Zentrifugation wurde der mRNA-haltige klare Überstand in neue Plastikröhrchen überführt und die mRNA in 120 μl 4 M Ammoniumazetat und 650 μl 100 % Ethanol für mindestens 30 Minuten auf -80 °C präzipitiert.

Nach 15 Minuten Zentrifugation wurde das Pellet in 90 % Ethanol gewaschen und dann für 10 Minuten luftgetrocknet. In der Zwischenzeit wurde das zuvor hergestellte Gel auf 50 W vorgewärmt (Power Supply 3000Xi, BioRad). Die getrockneten und ethanol-freien mRNA-Doppelstrang Proben wurden nun in 5 µl RNA-Gelelektrophoresefarbstoff (Pharmingen) gelöst und nach einer 5-minütigen Hitzedenaturierung bei 90 °C auf Eis gekühlt. Ein Standard wurde aus einer 1:100-Mischung von unhybridisierter antisense-mRNA-Sonde und Hybridisierungspuffer hergestellt. 2 µl dieses Gemisches wurden mit 3 µl RNA-Gelelektrophoresefarbstoff versehen und durchlief die Hitzedenaturierung und Abkühlung parallel zu den Proben.

4.) Nach gründlichem Waschen der Glasplatten und abspülen mit ddH₂O wurden sie mit KimWipes getrocknet. Die obere (abnehmbare) Glasplatte wurde mit 1 ml Silikon (SigmaCote, Sigma, St. Louis, Mo, USA) eingerieben, um eine spätere Adhäsion des Gels an dieser Platte zu vermeiden. Die beiden Glasplatten wurden zusammengelegt, wobei sie an ihren Rändern durch 0,4 mm dicke so genannte „spacer“ auseinander gehalten wurden, so dass das Gel, zwischen die Glasplatten gegossen, eine ebensolche Dicke hatte. Die Platten wurden an den Seiten zusammengepresst, und der Boden wurde durch eine Vorrichtung abgedichtet, die es erlaubte, durch ein Loch die Gelkammer zu füllen.

Das 5%ige Acrylamidgel wurde hergestellt aus 30 ml 6%iger Sequenziergel-Lösung (Sequenziergel-Lösung ultra pure SequaGel 6, National Diagnostics, Hessele Hull, UK), 7,5 ml Sequenziergel-Puffer (Sequenziergel-Puffer ultra pure SequaGel Complete, National Diagnostics) und 300 µl 10%iger Ammoniumpersulfat-Lösung (Bio-Rad). Dieses Gemisch wurde mit Hilfe einer Spritze in die Gelkammer gefüllt. Ein Plastikamm wurde am oberen Rand des Gels eingebracht und sparte Mulden zum Einfüllen der RNA-Proben aus. Nach ca. 2 Stunden war das Gel auspolymerisiert. Der Kamm wurde entnommen und das Gel vertikal in die Elektrophorese-Maschine (Sequi-Gen GT Sequencing Cell, BioRad) gestellt. Um einen elektrischen Kontakt in vertikaler Richtung über das Gel herzustellen, wurde eine hinter dem Gel befindliche Glaskammer und der Boden der Elektrophorese-Maschine mit 0,5 X TBE-Laufpuffer (0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,3 Merck) gefüllt. Das Gel hatte so am oberen, sowie am unteren Ende Kontakt zum Laufpuffer und somit zum Strom. In die Mulden des vorgewärmten Gels wurde die Lösung mit den in denaturiertem Zustand fixierten mRNA-Einzelsträngen pipettiert und unter Anlegung einer Spannung von ca. 1900 V (60 W) elektrophoretisch aufgetrennt.

2.4.4 Auswertung

Sobald das Gel zu Ende gelaufen war, wurde es mit Hilfe eines gleich großen Filterpapiers aus der Elektrophoresekammer genommen, mit Polyvinylchlorid-Folie bedeckt, in einem Gel-Trockner (Vacuum Gel Dryer Model 583, BioRad, München, Deutschland) bei 70 °C getrocknet und mit dem Filterpapier verbacken. Zunächst wurde von dem so fixierten Gel eine Autoradiographie auf Röntgenfilm gemacht. Anschließend wurde das Gel einem „Phosphorimager-Screen“ (Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) ausgesetzt. Diese speziellen Filme zur quantitativen Auswertung mussten mit einem Laserscanner (Scanner FLA 3000, Fujifilm) ausgelesen werden. Der Scanner detektiert die Anzahl der Signale, bezogen auf die Fläche des Films. Die so entstandenen Daten werden mit dem Computerprogramm AIDA Image Analyzer Version 3.45 (Raytest GmbH, Sprockhövel, Deutschland) ausgewertet. Das Ergebnis des Scannens stellte sich als Abbildung des Gels dar, wobei die Intensität der Banden die Anzahl der Signale pro Flächeneinheit widerspiegelte. Im Zuge der Auswertung wurden die Banden als Höhepunkte eines Graphen dargestellt, wobei die Integrale der Flächen unter den Höhenpunkten der Graphen der Anzahl der Signale pro Bande proportional waren. Die für die jeweiligen Transkripte so errechneten Werte werden nun zu den Werten von L32 normalisiert.

Diese so genannten „housekeeping-genes“ werden als interne Standards bei Versuchen zur Quantifizierung von RNA benutzt. GAPDH, ein wichtiges Enzym der Glykolyse, und L32 ein ribosomales Protein, werden in Zellen unterschiedlichen funktionellen Zustandes annähernd konstant exprimiert und eignen sich somit zur Normalisierung (Müller et al., 2001).

Im Ergebnisteil dieser Arbeit ist außer der statistischen Auswertung in Form von Histogrammen eine repräsentative Autoradiographie der mRNA-Banden jedes Zytokins und die dazu gehörenden Banden der „housekeeping-genes“ L32 dargestellt.

2.5 Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.5.1 Proteinisolation für ELISA

Zunächst wurde ein ELISA-Puffer, bestehend aus 0,4 ml Protease-Inhibitor (Roche, Mannheim, Deutschland), 9,6 ml PBS (Merck), 10 µl Triton X-100 (Sigma) und 10 µl PMSF (Sigma), hergestellt. Die in flüssigem Stickstoff gefrorenen Lungen wurden einzeln in einem eiskalten Mörser (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zerkleinert. Die pulverisierten Lungen wurden mit einem ebenfalls in Stickstoff gekühlten Spatel in Homogenisator-Röhrchen

überführt, in 1 ml eiskalten ELISA-Puffer aufgenommen und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal 20fach homogenisiert (Homogenisator RM-17, Janke & Kunkel KG, Stauffen im Breisgau, Deutschland). Dazwischen wurden sie 10 Minuten auf Eis inkubiert und der Homogenisator mit ddH₂O gereinigt. Danach wurden die Proben in 1,5 ml Plastikröhrchen überführt und für 15 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die aus den Lungen isolierten Proteine.

Zur Überprüfung der Proteinkonzentration und zur Errechnung des für den ELISA verwendeten, wurde die Proteinkonzentration mit einem BCA Protein Assay-Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) gemessen. Das Versuchsprinzip ist der Nachweis von einwertigen Kupferionen durch Bichinonsäure (BCA) (Smith et al., 1985), die bei der Reduktion von zweiwertigen Kupferionen durch Proteine in alkalischem Milieu (Biuret-Reaktion) entstehen. Das Kit enthielt zwei Lösungen, welche im Verhältnis 50:1 gemischt wurden. Danach wurde 1 ml dieser Mischung mit 2 µl Proteinlösung in Plastikküvetten (Sarstedt) pipettiert und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm mit einem Photometer (Biophotometer, Eppendorf Neteler Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) gemessen. Jede Probe wurde zweimal gemessen und mit Hilfe des „Lambert-Beer’schen Gesetztes“ aus der Extinktion unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Proteinkonzentration errechnet.

Zuletzt wurde das isolierte Protein auf drei neue 1,5 ml Röhrchen verteilt und bei -80 °C konserviert.

2.5.2 Durchführung des ELISA

Mit Hilfe des Quantikine® ELISA Kit (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland) wurde die Proteinkonzentration von IL-6, TNF α und IL-1 β in den Lungen von WT- und KO-Mäusen nach Stimulation mit 1668-Thioat gemessen. Bei dem benutzten Kit handelte es sich um einen so genannten solide Phasen-Sandwich ELISA. Standards und Proben wurden auf eine mit monoklonalem Anti-Maus Antikörper beschichtete 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert, wobei jeweils zwei Ansätze gemacht wurden, aus denen später der Mittelwert berechnet werden konnte. In den Proben vorhandenes Zielprotein wurde von den immobilisierten Antikörpern gebunden, während andere, ungebundene Substanzen im nächsten Schritt durch Waschen entfernt wurden. Anschließend wurde ein polyklonaler Anti-Maus Antikörper, der fest mit dem Enzym Peroxidase verbunden war, zu jeder Probe pipettiert. Nach einem weiteren Waschschrift, der überschüssige Antikörper entfernte, wurde eine Substratlösung hinzugegeben. Der enzymatische Abbau des Substrates, der zu einer

Farbänderung der Proben führte, wurde nach 30 Minuten durch eine Stopp-Lösung beendet. Die Intensität der Farbe im Reaktionsgemisch war direkt proportional zur Menge an Zielprotein in der Probe. Die optische Dichte wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und mit Hilfe der Standardkurve die Konzentration von IL-6, TNF α und IL-1 β in den Proben errechnet (ELISA-Reader, BioRad).

Bei der Durchführung des Versuches wurde sich streng an das vom Hersteller des ELISA Kits vorgegebene Protokoll gehalten. Die Sensitivität des ELISA wurde vom Hersteller geprüft. Die minimale detektierbare Dosis beträgt 1,6 pg/ml. Signifikante Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen konnte vom Hersteller ausgeschlossen werden.

2.6 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

2.6.1 Einleitung

Neben dem RPA wurde im Rahmen dieser Arbeit die RT-PCR zur Analyse von mRNA benutzt. Der Vorteil der Methode liegt in der hohen Sensitivität. Im Prinzip ist man in der Lage, ein einziges Transkript aufzuspüren, zu amplifizieren und auf einem Agarosegel sichtbar zu machen.

Nachdem die RNA aus dem Gewebe oder aus der Zellkultur isoliert wurde, ist es notwendig, sie zur Amplifikation in DNA umzuschreiben. Hierzu benötigt man RNA-abhängige DNA-Polymerasen, die aus Retroviren isoliert werden können. Die so gewonnene cDNA kann auf herkömmliche Weise mit einer Taq-Polymerase amplifiziert werden. Eine Alternative ist die Tth-Polymerase, die sowohl RT- als auch DNA-Polymerase Aktivität besitzt und deshalb für beide Schritte zu gebrauchen ist. Da die Tth-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* stammt, ist sie im Gegensatz zu den anderen reversen Transkriptasen hitzestabil. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 60 bis 70 °C. Dies ist ein weiterer Vorteil, da die höhere Temperatur im RT-Schritt hilft, Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen und damit die Anlagerung des Primers erleichtert.

Nach 30 – 35 Zyklen liegt normalerweise genügend Produkt zur weiteren Analyse vor. Bei sehr geringen Ausgangskonzentrationen werden 40 – 50 Zyklen benötigt.

Das PCR-Produkt wird auf ein Agarosegel aufgetragen, das Ethidiumbromid enthält. Dieses bildet mit DNA Komplexe, die unter UV-Licht als fluoreszierende Banden sichtbar werden.

2.6.2 Durchführung der RT-PCR

In der vorliegenden Arbeit wurden die Lungen von vier WT- und vier KO-Mäusen sechs Stunden nach Injektion von DGal und 1668-Thioat mittels RT-PCR auf induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) mRNA Expression untersucht. Als interner Standard wurde gleichzeitig die mRNA des „housekeeping genes“ β -Aktin untersucht, um eine halb-quantitative Aussage machen zu können. Da nur sehr wenig iNOS mRNA vorhanden war, wurden 45 PCR Zyklen benötigt.

Die RNA Isolation, reverse Transkription und DNA-Amplifikation wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Klaus Fink in den Räumen des Pharmakologischen Institutes der Universität Bonn durchgeführt.

2.7 Bronchoalveoläre Lavage (BAL) nach CpG-DNA Stimulation

2.7.1 Einleitung

In der BAL von gesunden, pathogenfreien Mäusen lassen sich Granulozyten nachweisen. Auf einen inflammatorischen Stimulus hin, kommt es zur Rekrutierung und die Anzahl der Granulozyten in der Lunge nimmt zu. In dieser Arbeit wurde die Anzahl der inflammatorischen Zellen in der Lunge als ein Indikator für den inflammatorischen Effekt von CpG-DNA Stimulation verwendet.

2.7.2 Durchführung BAL

Nach einer dreistündigen intraperitonealen Stimulation mit CpG-DNA wurden die Mäuse kurz anästhesiert und die Trachea mittels eines 18 Gauge Katheters kanüliert. Die Lavage erfolgte mit einem Volumen von zweimal 0,5 ml PBS. Eine kleine Teilprobe einer jeden BAL wurde mit einem gleichgroßen Volumen Turks's Solution gemischt. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte mittels eines Haemocytometers. Die Anzahl der unterschiedlichen Zellen wurde durch Zytospin bestimmt.

2.8 Flow Zytometrie

2.8.1 Einleitung

Zum Nachweis der Aufnahme von CpG-DNA Aufnahme im Lungengewebe wurde in der vorliegenden Arbeit die „Fluorescent-activated cell sorting“ (FACS) Analyse verwendet. Hierfür erfolgte eine dreistündige i.v. Stimulation der Mäuse mit 5 nmol CpG-DNA, an welche der Fluoreszenzmarker Cy5 (ODN 1668-Cy5) gebunden war. Der Nachweis erfolgte sowohl im Lungengewebe, als auch im Blut.

4.8.2 Durchführung

Nach Stimulation wurden die Lungengewebe fragmentiert und in GBSS – Puffer mit Kollagenase für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen separiert und in PBS gewaschen (1.500 rpm, 10 min, 4° C). Das Zellpellet wurde in einem Percoll Dichtegradienten (40 % / 80 %) für 20 min mit 2.000 rpm. und Raumtemperatur aufgetrennt. Zellen aus der Interphase wurden isoliert und in PBS gewaschen (1.500 rpm, 10 min, 4 °C). Anschließen wurden die Zellpellets in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Für die FACS-Färbung wurden die pulmonalen Zellen wieder gewaschen (5 min, 1.500 rpm, 4 °C). Nach Resuspension in 50 µl FACS-Puffer wurden die Zellen mit CD11c-FITC für dendritische Zellen, CD11b-PE für Makrophagen und dem biotinylierten Antikörper für ME-9F1 zur Detektion von Endothelzellen, welche anschließend mit Cy5.5 gekoppeltem Streptavidin (SA) angefärbt wurden, behandelt. nach Waschen in FACS-Puffer wurden die Zellen in 4 % Paraformaldehyd (15 min, 4 °C) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in FACS-Puffer (5 min, 1.500 rpm, 4 °C) gewaschen und in 200 µl zur Analyse resuspendiert. Sämtliche Antikörper sowie das Cy5.5 gekoppelte Streptavidin wurden von BD Pharmingen (San Diego, USA) bezogen. Die Proben wurden mit FACSCalibur (BD Pharmingen) gemessen und mit Cell Quest analysiert.

2.9 Statistik

Im Rahmen der Auswertung der Ergebnisse kamen im Anschluss an die Experimente jeweils unterschiedliche statistische Verfahren zum Einsatz, die im Weiteren kurz im Zusammenhang erläutert werden sollen.

2.9.1 RPA

Die autoradiographischen Daten wurden mittels der Software AIDA Image Analyzer Version 3.45 (Raytest GmbH, Sprockhövel, Deutschland) erhoben wurden. In Excel wurden die Daten aus allen RPAs zusammen geführt. Insgesamt gab es 10 Gruppen: WT-Mäuse und KO-Mäuse zu den Zeitpunkten null, eine, zwei, vier und sechs Stunden nach Injektion von DGal und 1668-Thioat. In jeder Gruppe wurden fünf Mäuselungen auf die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α untersucht. Mit Microsoft Excel wurden Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte berechnet und die Histogramme erstellt. Mit WinSTAT 3.0 wurde eine multifaktorielle Varianzanalyse (2-Wege-Anova) mit einer Bonferoni post-hoc-Analyse durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

2.9.2 ELISA

Mit einem ELISA-Reader (Bio-Rad) wurde die optische Dichte der Reaktionslösung gemessen und durch Vergleich mit der Standardkurve unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Zytokinkonzentration in pg/ml errechnet. Dieser Wert wurde mit der Gesamtproteinkonzentration aus den Mäuselungen, gemessen mit einem BCA Protein Kit in mg/ml, multipliziert, so dass man die Zytokinmenge in pg pro mg Gewebe bzw. Lungenprotein erhielt.

Mit Microsoft Excel wurden Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte berechnet, und mit WinSTAT 3.0 eine multifaktorielle Varianzanalyse (2-Wege-Anova) mit einer Bonferoni post-hoc Analyse durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

2.9.3 EMSA

Da es bei diesem Experiment keinen internen Standard gibt, wird üblicherweise keine statistische Auswertung durchgeführt. Stattdessen wurde eine Autoradiographie angefertigt, auf der die Unterschiede augenfällig zu erkennen sind.

2.9.4 RT-PCR

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte in Kooperation mit Prof. Klaus Fink, Pharmakologisches Institut der Universität Bonn. Es wurde die optische Dichte der Banden auf einem Agarosegel bestimmt. Dabei wurden die Werte von iNOS, zu denen des „housekeeping genes“ β -Aktin normalisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Manifestation der Infektion

Zunächst wurde den Wildtyp (WT) Mäusen und den TLR9-defizienten (TLR9-D) Mäusen D-Galactosamin (1g/kg KG) intraperitoneal (i.p.) appliziert. 30 Minuten nach dieser Vorbehandlung erfolgte bei allen Tieren eine i.p. Verabreichung von 1nmol/g KG CpG-DNA (1668-Thioat; Tibmolbiol, Berlin, Germany)

Die Mäuse wurden auf klinische Symptome einer Infektion hin untersucht. Zwei Stunden nach Stimulation entwickelten die WT Mäuse schockähnliche Symptome. Die Tiere wiesen Fellveränderungen in Form von gekräuselten Haaren auf, die Augen begannen zu tränen und die Mäuse wurden lethargisch. Im Gegensatz dazu traten bei den TLR9-D Tieren keine dieser Symptome auf.

3.2 TLR9-Expression in der Lunge

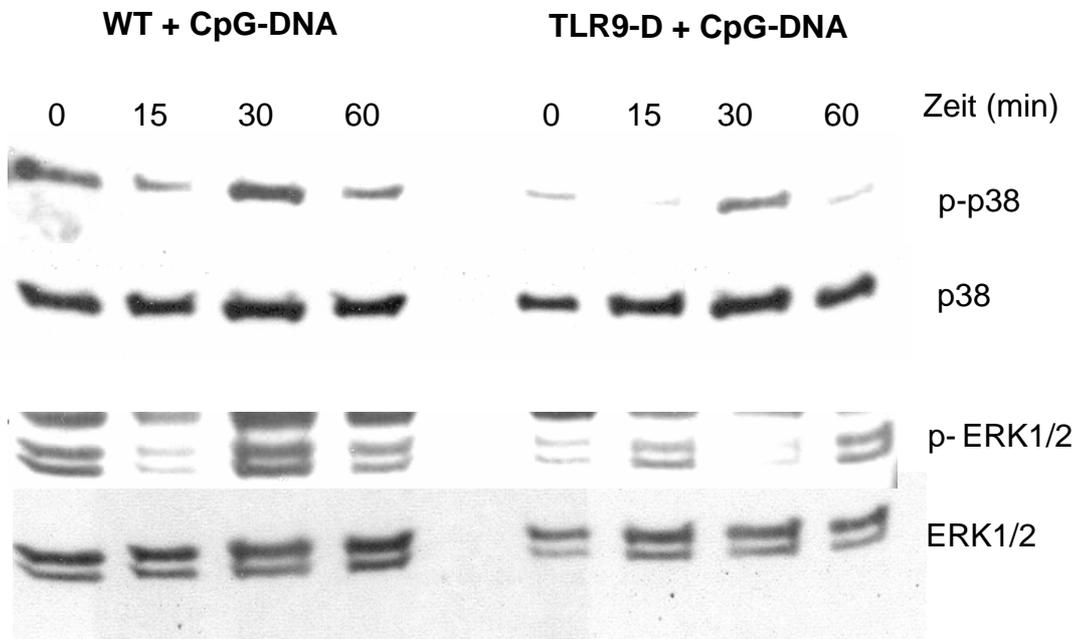
Kürzlich veröffentlichte Studien belegen die Expression von TLR9 in verschiedenen Geweben (Kumar und Yu, 2006; Zarembler und Godowski, 2002). Inzwischen konnte TLR9 in murinen RAW264.7 Zellen, in den Endothelien von Mäuselungen nachgewiesen werden godowski (Li et al., 2004a), (Yamada et al., 2004), (Droemann et al., 2005).

Mittels RT-PCR wurde die Existenz von TLR9 in nativem Lungengewebe der Maus bestätigt. Western-blot Analysen wurden ebenfalls durchgeführt, um eine zeitabhängige TLR9 Regulation nach CpG - Stimulation zu untersuchen. Hier konnte bisher keine zeitabhängige Regulation für den Rezeptor dokumentiert werden.

3.3 Pulmonale Aktivierung von MAP Kinasen

Die TLR9-Signaltransduktionskaskade beinhaltet die Aktivierung von Kinasen, wie der c-Jun NH₂-terminal Kinase, p38 und der IκB Kinase (IKK). Die Expression dieser „Mitogen Activated Protein Kinases“ (MAPK) im Lungengewebe wurde mittels Western-Blot Analyse

untersucht. Nach Stimulation kommt es zu einer Aktivierung der beiden MAPKs p38 und ERK1/2 erkennbar an der Zunahme der Phosphorylierung von p-p38 und p-ERK1/2.



(Abbildung 2). Hier erkennt man zum Zeitpunkt 30 Minuten nach CpG Stimulation eine starke Phosphorylierung sowohl von p38 als auch von ERK1/2 bei WT Mäusen, während im Gegensatz dazu es bei den TLR9 defizienten Tieren nur zu einer geringen Aktivitätszunahme kommt.

3.4 Pulmonale NFκB-Aktivierung

Am distalen Ende der TLR9-Signalkaskade kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB. Der unter Ruhebedingungen im Zytosol gebundene Transkriptionsfaktor transloziert nach Aktivierung in den Nukleus. Die Abbildung 3 zeigt einen repräsentativen Ausschnitt einer EMSA-Autoradiographie mit den Zeitpunkten 0, 1, 2, 4 und 6h nach Stimulation. Bei den WT-Tieren ist eine deutlich höhere Intensität der Banden mit einem Maximum der Expression zum Zeitpunkt 2h zu erkennen, welche die Aktivitätszunahme von NFκB widerspiegelt. Im Gegensatz dazu wurde bei den TLR9-D Tieren nur eine minimale Zunahme der NFκB-Aktivität beobachtet.

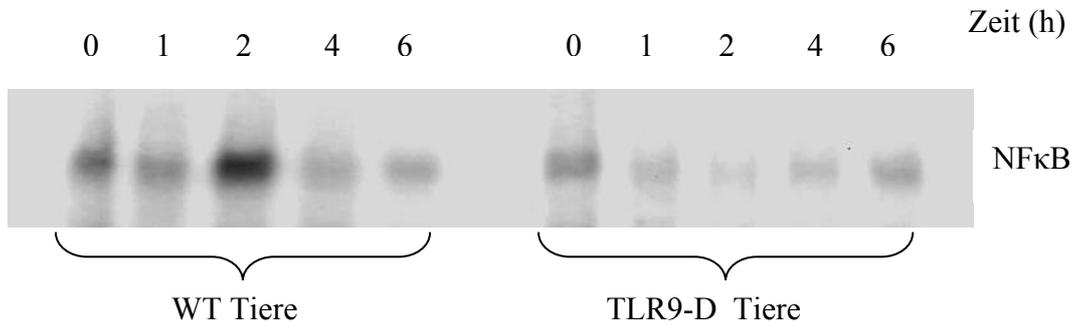


Abbildung 3: Toll like Rezeptor 9 (TLR9) abhängige NFκB Aktivierung in der Lunge. Bei den WT-Tieren ist ein starker Anstieg der NFκB Bindungsaktivität zum Zeitpunkt 2h nach CpG Applikation zu beobachten, während im Gegensatz dazu die TLR9-D Tiere keine Zunahme der NFκB Bindungsaktivität aufweisen.

3.5 Pulmonale Zytokin-mRNA Expression

Um die Bedeutung des TLR9-Signaltransduktionswegs für pulmonale Zytokinexpression zu nach CpG-DNA Verabreichung zu analysieren, wurde das Lungengewebe von WT- und TLR9-D Mäusen, mittels RNase Protection Assay untersucht. In Abbildung 4 ist die mRNA Expression von TNF α (TNF α mRNA/L32 mRNA) und IL-1 β (IL-1 β mRNA/L32 mRNA) dargestellt. Die Applikation von 1668-Thioat führte zu einem raschen Anstieg der TNF α und IL-1 β mRNA in den Lungen der WT Mäuse. Der Höchstwert der Zytokinexpression wurde für den Zeitpunkt 2h nach Stimulation ermittelt. Die densometrischen Analysen in den Abbildungen 5 A und B zeigen, dass die Expression der mRNA proinflammatorischer Zytokine von TNF α und IL-1 β in WT Mäusen zum Zeitpunkt 1h und 2h nach CpG-DNA Applikation signifikant höher war im Vergleich zu TLR9-D Tieren ($p \leq 0.05$, ANOVA, $n=5$).

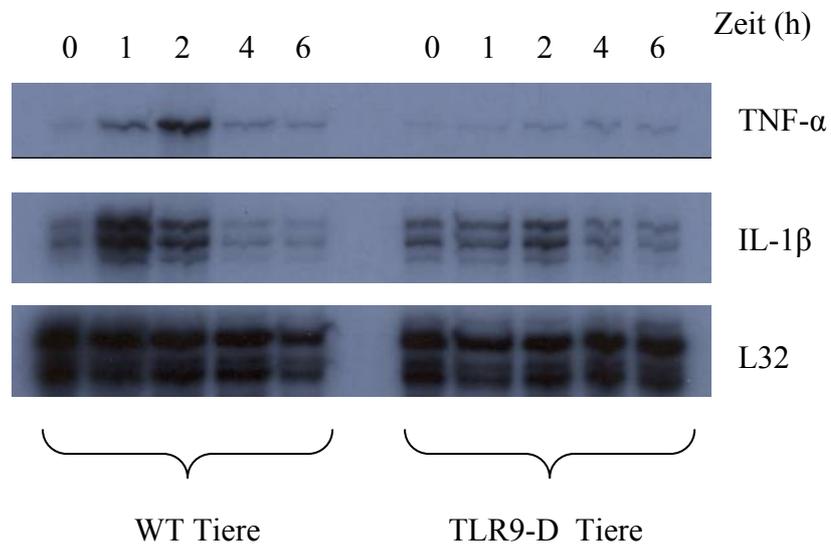
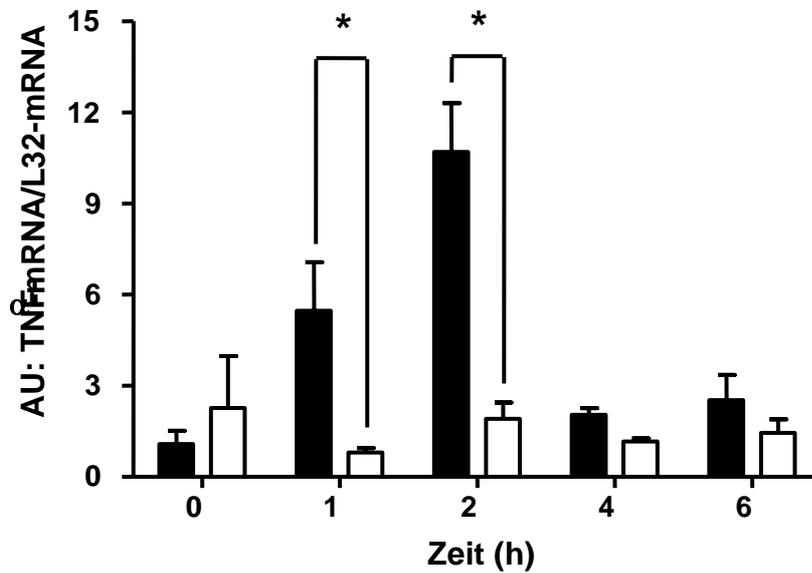


Abbildung 4: Zeitverlauf der pulmonalen Expression proinflammatorischer Zytokin mRNA TNF- α , IL-1 β und des „housekeeping“ Gens L32 nach CpG-DNA Stimulation in WT- und TLR9-D Mäusen.

■ WT
□ TLR9-D

A



B

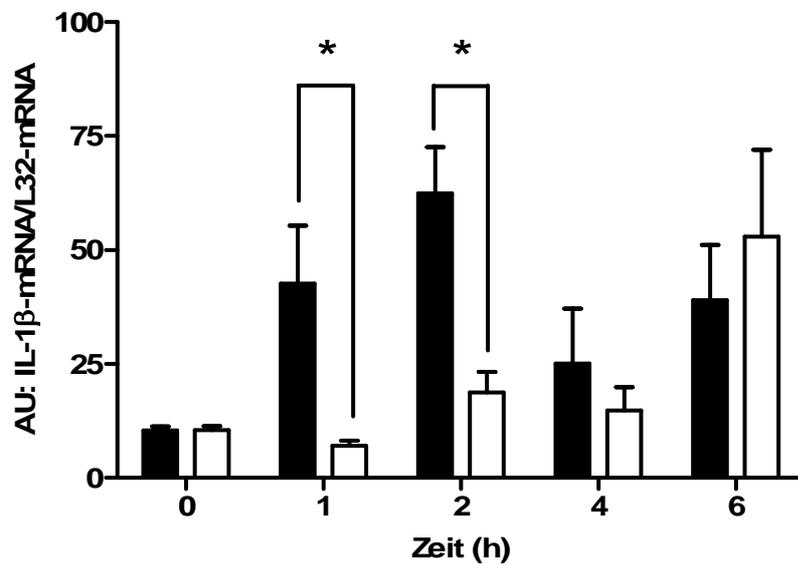


Abbildung 5: Die Histogramme Zeigen die pulmonale mRNA Produktion von A: TNF- α und B: IL-1 β in WT und TLR9-D Tieren zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h, 4h und 6h Stunden nach CpG-DNA Stimulation in Relation zu L32. Mittelwert \pm SEM; *=signifikant gegen TLR9-D zum gleichen Zeitpunkt. Multifaktorielle Varianzanalyse (2-Wege-Anova) mit einer Bonferoni post-hoc-Analyse (n=5 Tiere pro Zeitpunkt).

3.6 Proteinkonzentration von Zytokinen im Lungengewebe nach CpG Stimulation

Zum Nachweis, dass ein Anstieg von NF κ B und mRNA auch tatsächlich zu einer Zunahme der Zytokin-Proteinexpression führen, wurde die Zytokinexpression ebenfalls auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden die Zytokin-Proteingewebespiegel von TNF- α und IL-1 β mit einem ELISA gemessen. Analog zum RPA wurden WT- und TLR9-D-Mäuse zu den Zeitpunkten eine, zwei, vier, und sechs Stunden nach Stimulation mit D-GalN und CpG-DNA untersucht. Die Abbildungen 5 A und B zeigen, dass es bei den WT-Tieren nach CpG-Stimulation zu einem signifikanten Anstieg der Proteinexpression von TNF- α und IL-1 β zu den Zeitpunkten 1h mit einem Maximum 2h nach CpG Stimulation, im Vergleich zu den TLR9-D Tieren kommt. (TNF α : 11,3 pg/mg gegenüber 2,4 pg/mg; $p \leq 0,001$; IL-1 β : 265,1 pg/mg gegenüber 53,1 pg/mg; $p \leq 0,001$). Die Abbildung 6 zeigt, dass die Kinetik der TNF α und IL-1 β Proteinproduktion mit den Anstiegen der entsprechenden mRNA übereinstimmt.

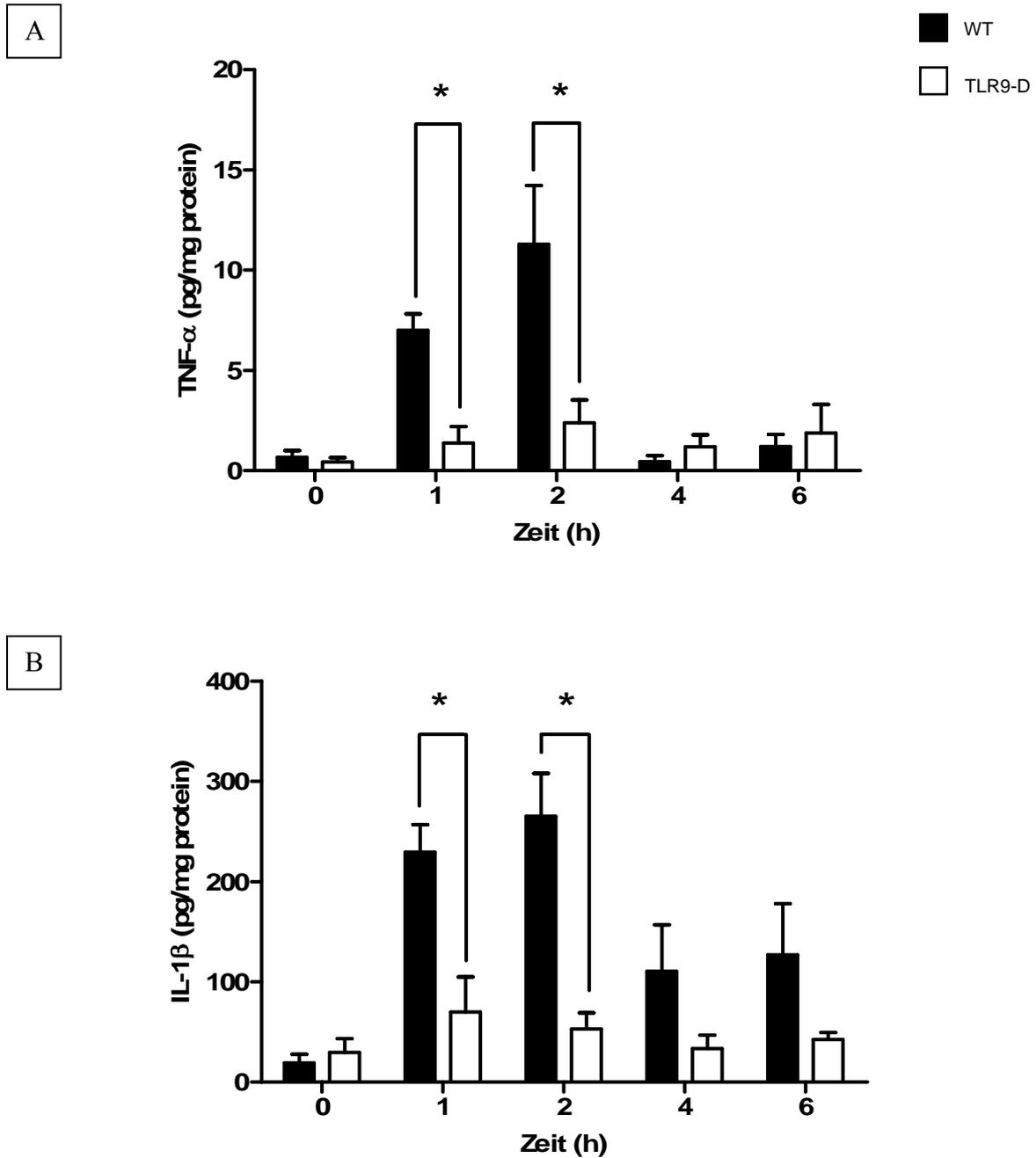


Abbildung 6: Die Histogramme zeigen die pulmonale Zytokinproduktion von A: TNF- α und B: IL-1 β in WT und TLR9-D Tieren zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h, 4h und 6h Stunden nach Stimulation mit CpG-ODN 1668-Thioat in Relation zur insgesamt isolierten Proteinmenge. Mittelwert \pm SEM; *=signifikant gegen TLR9-D zum gleichen Zeitpunkt. Multifaktorielle Varianzanalyse (2-Wege-Anova) mit einer Bonferoni post-hoc-Analyse (n=5Tiere pro Zeitpunkt).

3.7 Pulmonale iNOS-mRNA Expression nach CpG-DNA Stimulation

Die Applikation von CpG-DNA induziert im Lungengewebe der WT Mäuse eine signifikante Zunahme der iNOS mRNA Expression (0.013 ± 0.006 ; $n=5$), wohingegen bei den TLR9-D Tieren keine iNOS mRNA nachgewiesen werden konnte (Abb. 7).

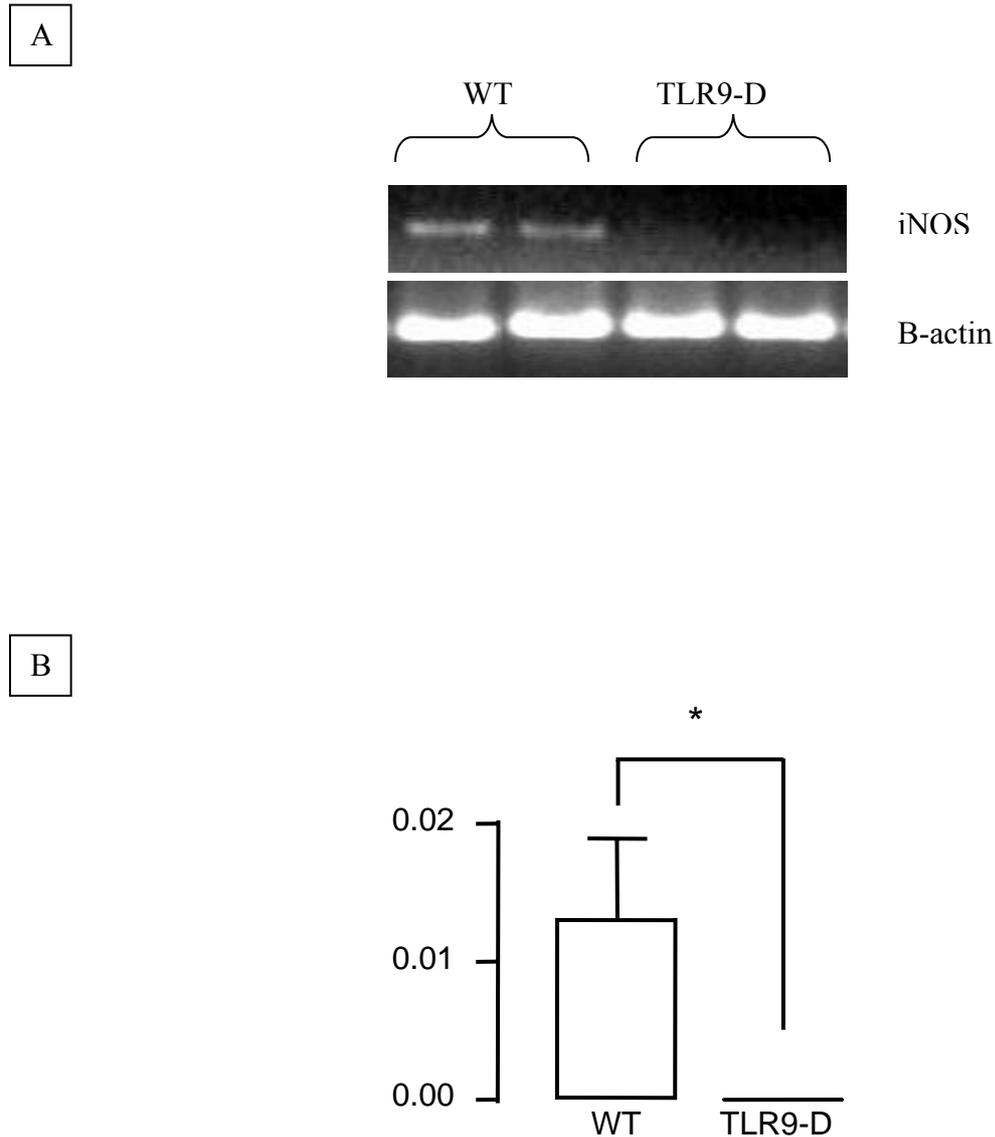


Abbildung 7: Die Photographie zeigt die im UV-Licht fluoreszierenden Banden der mRNA von iNOS und β -Aktin bei WT- und TLR9-D-Mäusen vier Stunden nach Stimulation mit D-GalN und 1668-Thioat. T-Test ($n=2$ Tiere pro Gruppe)

3.8 Bronchoalveoläre Lavage (BAL) nach CpG-DNA Stimulation

In der BAL gesunder, unter pathogenfreien Bedingungen gehaltenen Mäusen sind Granulozyten nur in geringer Anzahl vorhanden. Bei einer Inflammation kommt es zur Einwanderung der Zellen in die Alveolen. Daher wurde in unserem Modell für eine akute Lungenentzündung die Anzahl der Granulozyten als Indikator für den inflammatorischen Effekt von CpG-DNA gewählt. Die Abbildungen 8 A und B zeigen einen signifikanten Anstieg der Gesamtzellzahl sowie der neutrophilen Granulozyten in der BAL von WT Tieren nach CpG-DNA Stimulation. Im Gegensatz dazu konnte in der BAL der TLR9-D Tiere kein Anstieg neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden. Da die BAL aller drei Gruppen keine Blutkontamination aufwies, schließen wir daraus, dass die Entzündungszellen durch Migration in den Alveolarraum gelangt sind.

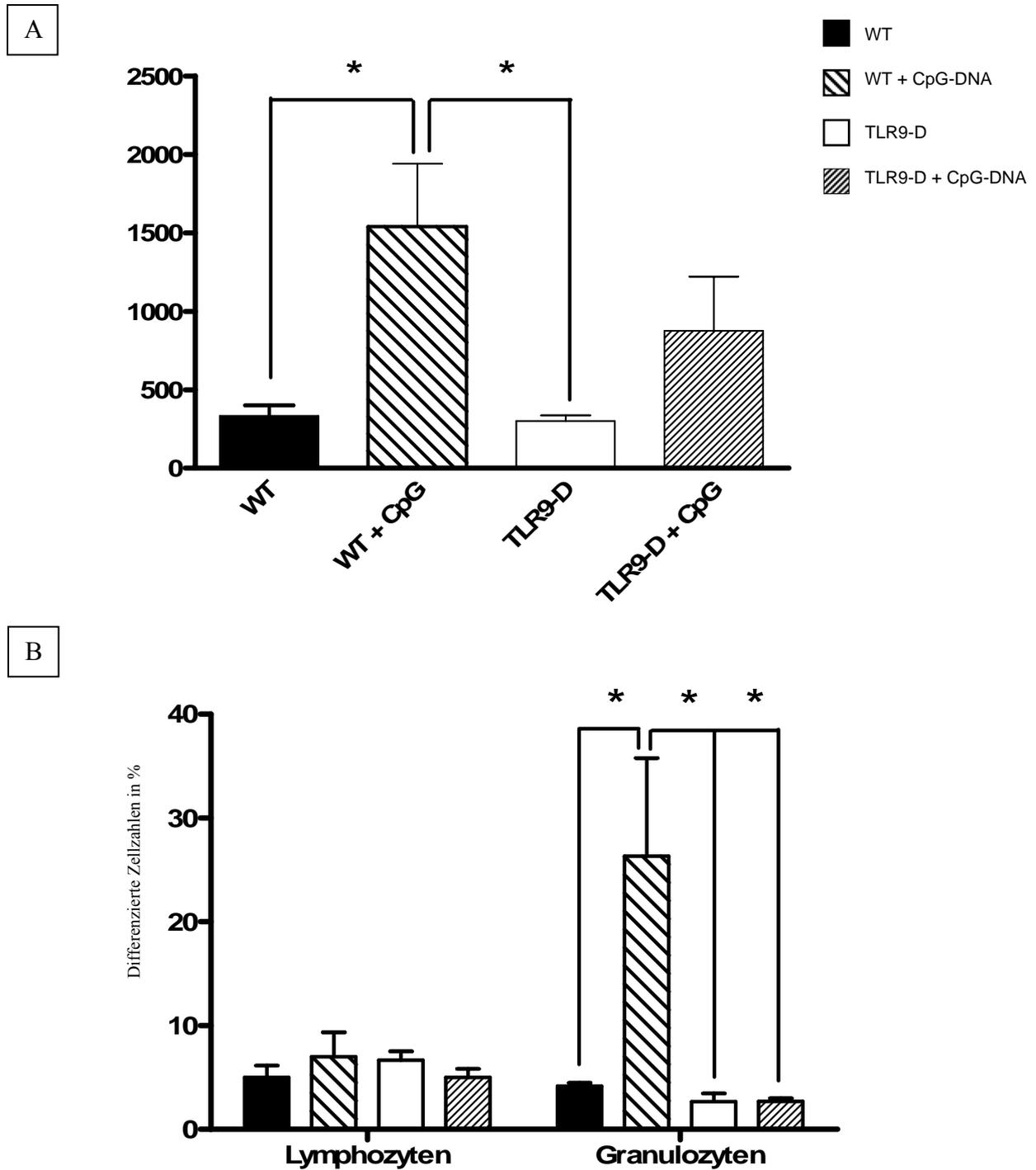


Abbildung 8: A: Gesamtzellzahl und B: differenzierte Zellzahlen aus der BAL von WT (n=3) und TLR9-D (n=3) Mäusen nach 3h i.p. Stimulation mit CpG-DNA. T-Test (n=7 Tiere pro Gruppe)

3.9 Pulmonale FACS-Analyse nach CpG-DNA Stimulation

Zur weiteren Beschreibung der in das zelluläre Rekrutment nach CpG-DNA Stimulation involvierten Mechanismen wurde die CpG-DNA Aufnahme im Lungengewebe quantitativ und qualitativ untersucht. Hierzu erfolgte eine dreistündige intravenöse Stimulation von WT Mäusen mit 5 nmol fluoreszenz markierter CpG-DNA (CpG ODN 1668-Cy5). Abbildung 9 zeigt mittels FACS Analyse die Aufnahme von CpG-DNA in 39% der isolierten Lungenzellen. Quantitative Analysen belegen die Aufnahme von CpG-DNA (Cy5 positive Zellen) von CD11b-positiven Zellen, Makrophagen (56,9%) und CD11c-positiven, dendritischen Zellen (33,6) (Abb. 10).

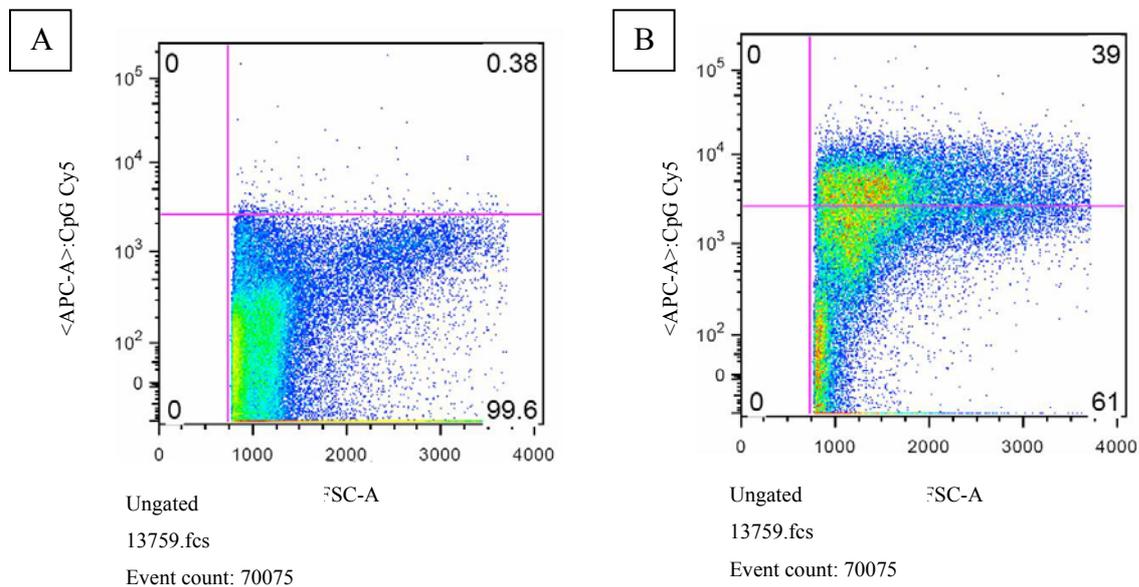


Abbildung 9: FACS Analyse Gesamtzellen Lungengewebe. A: unbehandeltes Tier. B: 3h nach CpG Cy5 behandeltes Tier.

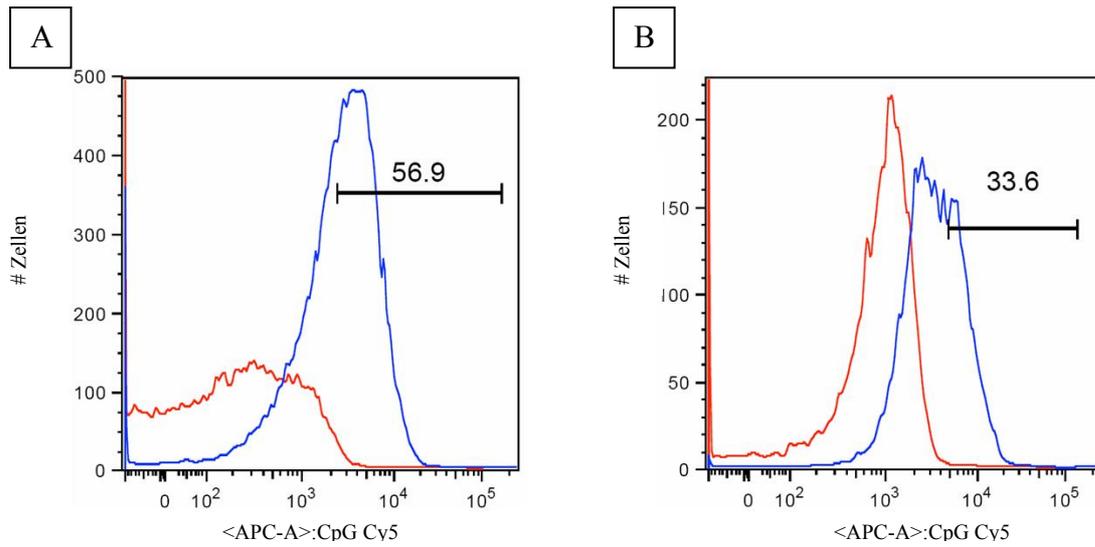


Abbildung 10: FACS Analyse, Quantitative Aufnahme von CpG-DNA (Cy5 positive Zellen) in A: CD11b-positiven Zellen, Makrophagen (56,9%) und B: CD11c-positiven, dendritischen Zellen (33,6%)

4. Diskussion

Die Inzidenz eines akuten Lungenversagens variiert zwischen 1,5 und 70 Fällen/100.000 Einwohnern/Jahr und die Mortalitätsrate übersteigt 50% (Estenssoro et al., 2002; Ferguson et al., 2005; Hudson und Steinberg, 1999; Lewandowski et al., 1995; Roupie et al., 1999; Thomsen und Morris, 1995). Diese Kombination aus einer relativ häufigen Inzidenz und einer hohen Mortalitätsrate führen zur besonderen Bedeutung des akuten Lungenversagens, sowohl für die Klinik, als auch für die Wissenschaft. Pathophysiologisches Korrelat des akuten Lungenversagens ist eine schwere Hypoxämie, aufgrund des großen pulmonalen Rechts-Links-Shunts als Ausdruck der Perfusion nichtventilierter Areale, sowie bilaterale pulmonale Infiltrationen, bedingt durch ein nichtkardiogenes Lungenödem. Bakterielle Infektionen gehören zu den Hauptursachen für die Entstehung eines akuten Lungenversagens und des septischen Schocks. Jedoch ist es nicht das infektiöse Agens selbst, sondern vielmehr die überschießende Entzündungsreaktion des Organismus, durch Produktion von Entzündungsmediatoren, darunter Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) und die induzierbare NO-Synthetase (iNOS), die für den häufig letalen Ausgang der Erkrankung verantwortlich ist. Körperfremde Stoffe sind über die so genannten „Pattern Recognition Receptors“ (PRR) in der Lage eine Entzündungsreaktion des Organismus zu induzieren. Toll Like Rezeptoren (TLR) sind eine Gruppe der PRR, die bakterielle Bestandteile erkennen. Der TLR9 wurde als primärer Rezeptor für bakterielle DNA identifiziert (Hemmi et al., 2000).

Die Überlegung, dass ein durch bakterielle DNA induziertes akutes Lungenversagen über den TLR9 ausgelöst werden kann, hat zur vorliegenden Untersuchung geführt.

4.1 Das Mausmodell zur Induktion eines akuten Lungenversagens

Die Bedeutung von bakterieller DNA für die durch eine Sepsis bedingte Entstehung eines akuten Lungenversagens wurde in einem Mausmodell untersucht. Das hierfür verwendete Cytosin-Phosphat-Guanosin-Oligodesoxynukleotids (CpG-ODN) induzierte bei den behandelten Mäusen eine Sepsis und führte dosisabhängig zum Tod (Cornelie et al., 2002). Das verwendete CpG-ODN 1668-Thioat induziert die Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Der hierfür spezifische PRR ist der TLR9 (Bauer et al., 2001). Beim 1668 Thioat handelt es sich um ein B-Klasse ODN mit durchgehendem Phosphothioat Rückgrat. Klasse-A und Klasse-C ODN benötigen höhere Konzentrationen, um mit Klasse-B ODN

vergleichbare TNF α und „nuklear factor κ B“ (NF κ B) Produktion bzw. Aktivierung zu erreichen und sind deshalb für dieses Mausmodell weniger geeignet (Vollmer et al., 2004).

Für die Entstehung einer Sepsis durch CpG sind die Stabilisierung der DNA durch Thioat und die vorhergehende Behandlung der Mäuse mit D-Galaktosamin (D-GalN) von entscheidender Bedeutung. Das Thioat bewirkt eine Stabilisierung der DNA und verhindert ihren Abbau durch Nukleasen. D-GalN führt zu einer leberspezifischen Depletion von UTP und Veränderungen an Uraylnukleotiden, so dass die Biosynthese makromolekularer Zellbestandteile wie RNA und Membranglykoproteine gestört ist. Dies bewirkt eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber TNF α , so dass bei erhöhter TNF α Produktion z. B. nach Injektion von LPS oder CpG-ODN eine fulminante Hepatitis hervorgerufen wird (Lehmann et al., 1987). Der Verlauf des durch Leberzellapoptose bedingten Leberausfalles kann durch die Bestimmung des Anstiegs der Leberenzyme nachverfolgt werden (Sparwasser et al., 1998).

CpG-DNA alleine bewirkt ausschließlich eine Aktivierung des Immunsystems über den TLR9, führt aber nicht zu einem TNF α vermittelten septischen Schock. Somit ist die artifizielle Provokation einer Hepatitis gerechtfertigt und notwendig, um den Einfluss von bakterieller DNA bei einem durch Sepsis bedingten akuten Lungenversagen zu untersuchen.

Die bei der vorliegenden Untersuchung verwendete Dosierung des Oligonukleotids von 20 nmol / Maus liegt deutlich im letalen Bereich (Cornelie et al., 2002). Es wurde ein sechsständiger Untersuchungszeitraum für die Messung der Zytokine gewählt, welchen die Mäuse überlebten.

Die Untersuchungszeitpunkte wurden in Anlehnung an andere Arbeiten so gewählt, dass das Maximum der Expression erfasst wurde (Fernandez et al., 2004). Alle Versuche erfolgten zu den gleichen Zeitpunkten sowohl an TLR9-defizienten (TLR9-D), als auch an Wildtyp Mäusen. Hierdurch wird der Nachweis erbracht, dass es sich bei den Beobachtungen um durch den TLR9 vermittelte Effekte handelt.

Ein Einfluss von D-GalN auf die mRNA / Protein-Expression im Lungengewebe konnte durch die Kontrollgruppen 0 h WT und 0 h TLR9-D ausgeschlossen werden. Diesen Mäusen wurden nach alleiniger Stimulation mit D-GalN für 30 Minuten die Lungen entnommen und den verschiedenen Untersuchungsmethoden unterzogen. Dabei zeigte sich weder auf mRNA- noch auf Protein-Ebene eine signifikante Steigerung der Zytokin-Expression. Da dies auch für die TLR9-D-Mäuse zu den weiteren Untersuchungszeitpunkten zutrifft, kann auch ein möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt aufgetretener Einfluss auf die Ergebnisse durch D-GalN ausgeschlossen werden.

4.2 Induktion inflammatorischer Mediatoren nach CpG-DNA Stimulation

Die vorliegende Arbeit konnte nachweisen, dass TLR9 für die Induktion inflammatorischer Zytokine und der im Lungengewebe bei einer CpG induzierten Inflammation nachgeschalteten Signaltransduktionskaskade von entscheidender Bedeutung ist. Wie in Vorarbeiten bereits beschrieben, (Li et al., 2004b; Yamada et al., 2004) konnte die Expression des Toll-Like Rezeptors 9 im Lungengewebe nachgewiesen werden. Unter der Annahme, dass eine pulmonale Aktivität von NF κ B der Expression zytokiner Gene und Proteine vorausgeht und diese NF κ B Aktivierung TLR9 abhängig ist, untersuchten wir die TLR9 abhängige NF κ B Aktivierung im Lungengewebe. In unserem Modell konnten wir einen starken Anstieg der NF κ B-DNA Bindungsaktivität bei WT-Mäusen nachweisen, während es im Gegensatz dazu im Lungengewebe der TLR9 defizienten Tiere nach CpG Stimulation zu einer nachlassenden Aktivität von NF κ B kam. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die TLR9 abhängige Signaltransduktionskaskade von entscheidender Bedeutung für die Induktion einer Inflammation ist.

NF κ B induziert die Genexpression inflammatorischer Mediatoren. Diese Mediatoren sind bei einer Sepsis für das Versagen unterschiedlicher Organfunktionen verantwortlich, so auch für das akute Lungenversagen. In der vorliegenden Studie führte die CpG-DNA Applikation zu einem signifikanten Anstieg der Expression proinflammatorischer Zytokine (TNF α , IL-1 β) im Lungengewebe. Dies konnte im Lungengewebe der WT-Tiere sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die inflammatorische Antwort auf die CpG-DNA Applikation blieb bei den TLR9 defizienten Tieren aus. Dies ist ein Beleg dafür, dass die CpG-DNA induzierte Zytokininduktion TLR9 abhängig ist. Des Weiteren beweisen der CpG-DNA induzierte NF κ B und Zytokinanstieg die Bedeutung der TLR9 vermittelten Inflammationskaskade für die Entstehung eines akuten Lungenversagens.

Es gibt Anzeichen dafür, dass das second messenger Molekül NO, welches durch die NO-Synthetase (NOS) erzeugt wird, eine zentrale Rolle bei der Entstehung eines akuten Lungenversagens spielt. Im gesunden Lungengewebe existieren mit der neutralen NO-Synthetase (nNOS) und der endothelialen NO-Synthetase zwei unterschiedliche Isoformen des Enzyms. Eine dritte Isoform, die induzierbare NO-Synthetase, welche in Epithelzellen gesunder Menschen und Tiere vorkommt kann als Antwort auf inflammatorische Zytokine und LPS ebenfalls im Lungengewebe erzeugt werden. Trotz widersprüchlicher Schlussfolgerungen über die Bedeutung von NO im Bezug auf die Entstehung eines akuten

Lungenversagens konnten bei iNOS defizienten Mäusen einen milderen Verlauf des akuten Lungenversagens und eine geringere Ausbildung pulmonaler Nitrotyrosine als bei verstorbenen Wildtypmäusen nachgewiesen werden (Kristof et al., 1998). Im vorliegenden Modell eines CpG-DNA induzierten Lungenversagens kommt es zur TLR9 abhängigen Induktion von pulmonalem iNOS. Im Vergleich zu den TLR9-D Mäusen konnten wir 5 Stunden nach CpG-DNA Stimulation bei den WT-Mäusen einen signifikanten Anstieg der iNOS mRNA Konzentration im Lungengewebe nachweisen.

Zur Beschreibung der weiteren Veränderungen nach CpG-DNA bedingter Inflammation untersuchten wir die Einwanderung von Entzündungszellen ins Lungengewebe durch bronchoalveoläre Lavage. Da polymorphe Zellen in der BAL gesunder, keimfreier Mäuse nur in einer sehr geringen Anzahl gefunden werden, wählten wir diese Anzahl als Parameter für den Nachweis des inflammatorischen Effektes der CpG-DNA. Hier konnte ein signifikanter Anstieg sowohl der absoluten Zellzahl, als auch der polymorphen Zellen bei WT Mäusen nach Stimulation nachgewiesen werden. Diese Daten belegen eine signifikante Einwanderung inflammatorischer Zellen in den Alveolarraum nach CpG Stimulation. Da bei den BALs keine Kontamination mit peripheren Blutzellen vorlag, kommen wir zu der Schlussfolgerung, dass die hier nachgewiesenen Entzündungszellen durch Migration in den Alveolarraum gelangt sind. Die Aufklärung der Frage, welche Zellgruppen für die TLR9 vermittelte Entzündungsreaktion im Lungengewebe verantwortlich sind, erfolgte durch eine Serie von FACS Experimenten. Die FACS Ergebnisse brachten den Nachweis einer signifikanten Aufnahme von CpG-DNA sowohl in Endothelien und Makrophagen, als auch in dendritischen Zellen. Diese Daten lassen die Annahme zu, dass die genannten Zellen eine entscheidende Bedeutung sowohl für die Initiierung einer Entzündungsreaktion auf CpG-DNA, als auch für die Synthese der untersuchten Mediatoren haben. Als Auswirkung der inflammatorischen Reaktion kommt es zur Einwanderung einer großen Anzahl unterschiedlicher Entzündungszellen in den Alveolarraum.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass bei einer durch bakterielle DNA induzierten Sepsis der TLR9 durch die Expression und Regulation relevanter Zytokine eine entscheidende Rolle für die Pathophysiologie eines akuten Lungeversagens spielt.

Anders als LPS hat bakterielle DNA aber auch wünschenswerte Effekte, die eventuell auch in der Sepsis, z.B. zur Behandlung der Immunparalyse durch Verhinderung der Lymphozytenapoptose, genutzt werden können (Hörner et al., 2004; Weighardt et al., 2000). Auch die ausgeprägte IL-12 Synthese, die durch CpG-DNA ausgelöst wird, könnte zu einem verbesserter Überlebensrate in der Sepsis führen (Weighardt et al., 2002).

5. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Funktion des angeborenen Immunsystems für die Entstehung eines ARDS durch bakterielle DNA. Trotz therapeutischer Fortschritte stellt das Auftreten eines ARDS im Rahmen einer bakteriellen Sepsis eine lebensbedrohliche Erkrankung dar, die häufig prognosebestimmend ist.

Dabei wird die pulmonale Schädigung nicht direkt durch das bakterielle Agens, sondern durch eine überschießende Immunreaktion ausgelöst. Diese mündet in der Produktion proinflammatorischer Zytokine (Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1 β) und anderer Mediatoren (induzierbare NO-Synthetase). Nachdem lange Zeit Lipopolysaccharide (LPS) im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses als Auslöser der Mediatoreninduktion standen, ist seit einiger Zeit bekannt, dass auch bakterielle DNA von gramnegativen und grampositiven Bakterien sowie synthetische Cytosin-Phosphat-Guanosin-Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN) in der Lage sind, eine Zytokinproduktion zu induzieren und eine akute pulmonale Entzündungsreaktion hervorzurufen. Dabei ist von Bedeutung, dass der Toll-like Rezeptor 9 (TLR9), der primäre Mustererkennungsrezeptor für bakterielle DNA, auch im Lungengewebe exprimiert wird.

Vergleichende Untersuchungen an Wildtyp (WT)- und TLR9-defizienten (TLR9-D)-Mäusen konnten zeigen, dass bakterielle DNA bzw. ein synthetisches Oligonukleotid (1668-Thioat) zu einer TLR9-abhängigen Aktivierung der TLR-Signalkaskade führen. Als Bestandteil der Signalkaskade unterhalb von TLR9 wurde der Transkriptionsfaktor NF κ B in der Gruppe der WT-Mäuse aktiviert, wohingegen keine Aktivitätszunahme in den TLR9-D Mäusen nachgewiesen werden konnte. Bei den WT-Mäusen war die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine (TNF, IL-1 β) sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant größer im Vergleich zu den TLR9-D-Mäusen. Als Hinweis für die funktionelle Relevanz der Zytokine wurde die Expression der iNOS durch reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) gemessen.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass CpG-DNA zu einer Aktivierung der TLR9-Signalkaskade führt. Die Aktivierung der verschiedenen Mediatoren und Effektormoleküle ist als Ausdruck einer pulmonalen Inflammation zu werten. Zukünftige Untersuchungen müssen klären, inwiefern bakterielle DNA eine funktionelle Relevanz in der Lunge im Sinne eines ARDS besitzt.

6. Referenzen

- 1 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: 1958-1968
- 2 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: 732-738
- 3 Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science.* 1999; 285: 736-739
- 4 Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell.* 1985a; 42: 791-798
- 5 Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell.* 1985b; 42: 779-789
- 6 Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet.* 1967; 2: 319-323
- 7 Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell.* 1996; 87: 13-20
- 8 Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu.Rev.Immunol.* 1996; 14: 649-683
- 9 Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2001; 98: 9237-9242
- 10 Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, LeGall JR, Morris A, Spragg R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1994; 149: 818-824
- 11 Bersten AD, Edibam C, Hunt T, Moran J. Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian States. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2002; 165: 443-448
- 12 Beutler B, Hoebe K, Georgel P, Tabeta K, Du X. - Genetic analysis of innate immunity: identification and function of the TIR adapter proteins. - *Adv Exp Med Biol.* 2005; 560: 29-39
- 13 Böcker. *Pathologie.* 2. 2000. München, Urban & Fischer.

- 14 Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine [see comments]. *Chest*. 1992; 101: 1644-1655
- 15 Cornelié S, Wiel E, Lund N, Lebuffe G, Vendeville C, Riveau G, Vallet B, Ban E. Cytosine-phosphate-guanine (CpG) motifs are sensitizing agents for lipopolysaccharide in toxic shock model. *Intensive Care Med*. 2002a; 28: 1340-1347
- 16 Droemann D, Albrecht D, Gerdes J, Ulmer AJ, Branscheid D, Vollmer E, Dalhoff K, Zabel P, Goldmann T. Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir. Res*. 2005; 6: 1
- 17 Esteban A, Fernandez-Segoviano P, Frutos-Vivar F, Aramburu JA, Najera L, Ferguson ND, Alia I, Gordo F, Rios F. Comparison of clinical criteria for the acute respiratory distress syndrome with autopsy findings. *Ann. Intern. Med*. 2004; 141: 440-445
- 18 Estenssoro E, Dubin A, Laffaire E, Canales H, Saenz G, Moseinco M, Pozo M, Gomez A, Baredes N, Jannello G, Osatnik J. Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2002; 30: 2450-2456
- 19 Ferguson ND, Frutos-Vivar F, Esteban A, Anzueto A, Alia I, Brower RG, Stewart TE, Apezteguia C, Gonzalez M, Soto L, Abroug F, Brochard L. Airway pressures, tidal volumes, and mortality in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2005; 33: 21-30
- 20 Fernandez S, Jose P, Avdiushko MG, Kaplan AM, Cohen DA. Inhibition of IL-10 receptor function in alveolar macrophages by Toll-like receptor agonists. *J. Immunol*. 2004; 172: 2613-2620
- 21 Fowler AA, Hamman RF, Good JT, Benson KN, Baird M, Eberle DJ, Petty TL, Hyers TM. - Adult respiratory distress syndrome: risk with common predispositions. - *Ann Intern Med*. 1983; 98: 593-597
- 22 Garber BG, Hebert PC, Yelle JD, Hodder RV, McGowan J. Adult respiratory distress syndrome: a systemic overview of incidence and risk factors. *Crit Care Med*. 1996; 24: 687-695
- 23 Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 1991; 351: 355-356
- 24 Hartmann G, Krieg AM. CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Ther*. 1999; 6: 893-903
- 25 Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; 96: 9305-9310
- 26 Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*. 1988; 52: 269-279

- 27 Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001; 410: 1099-1103
- 28 Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000; 408: 740-745
- 29 Hörner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Bardenheuer HJ, Weigand MA. Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis. *Der Anaesthesist*. 2004; 53: 10-28
- 30 Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J.Immunol*. 2002; 168: 4531-4537
- 31 Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am.J.Respir.Crit Care Med*. 1995; 151: 293-301
- 32 Hudson LD, Steinberg KP. Epidemiology of acute lung injury and ARDS. *Chest*. 1999; 116: 74S-82S
- 33 Irie T, Muta T, Takeshige K. TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Lett*. 2000; 467: 160-164
- 34 Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol*. 2002; 20:197-216. Epub; %2001 Oct 4.: 197-216
- 35 Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J.Exp.Med*. 2001; 194: 863-869
- 36 Katzenstein AL, Bloor CM, Leibow AA. Diffuse alveolar damage--the role of oxygen, shock, and related factors. A review. *Am.J.Pathol*. 1976; 85: 209-228
- 37 Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. - An evaluation of outcome from intensive care in major medical centers. - *Ann Intern Med*. 1986; 104: 410-418
- 38 Knuefermann P, Sakata Y, Baker JS, Huang CH, Sekiguchi K, Hardarson HS, Takeuchi O, Akira S, Vallejo JG. Toll-like receptor 2 mediates *Staphylococcus aureus*-induced myocardial dysfunction and cytokine production in the heart. *Circulation*. 2004; 110: 3693-3698
- 39 Krieg AM. Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA. *Trends Microbiol*. 1996; 4: 73-76
- 40 Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 1995; 374: 546-549

- 41 Kristof AS, Goldberg P, Laubach V, Hussain SN. Role of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-induced acute lung injury. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1998; 158: 1883-1889
- 42 Kumar A, Yu FS. Toll-like receptors and corneal innate immunity. *Curr.Mol.Med.* 2006; 6: 327-337
- 43 Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat.Immunol.* 2004; 5: 190-198
- 44 Lehmann V, Freudenberg MA, Galanos C. Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice. *J.Exp.Med.* 1987; 165: 657-663
- 45 Lewandowski K, Metz J, Deutschmann C, Preiss H, Kuhlen R, Artigas A, Falke KJ. Incidence, severity, and mortality of acute respiratory failure in Berlin, Germany. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1995b; 151: 1121-1125
- 46 Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J.Biol.Chem.* 1999; 274: 33419-33425
- 47 Luce JM. - Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. - *Crit Care Med.* 1998; 26: 369-376
- 48 Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M, Aardal S, Thorsteinsson A, Frostell CG, Bonde J. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF Study Group. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1999; 159: 1849-1861
- 49 Martin TR. Lung cytokines and ARDS: Roger S. Mitchell Lecture. *Chest.* 1999; 116: 2S-8S
- 50 McElroy MC, Pittet JF, Hashimoto S, Allen L, Wiener-Kronish JP, Dobbs LG. A type I cell-specific protein is a biochemical marker of epithelial injury in a rat model of pneumonia. *Am.J.Physiol.* 1995; 268: 181-186
- 51 Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 1997; 91: 295-298
- 52 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity [see comments]. *Nature.* 1997; 388: 394-397
- 53 Messina JP, Gilkeson GS, Pisetsky DS. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J.Immunol.* 1991; 147: 1759-1764
- 54 Metchnikoff, E. *Immunität bei Infektionskrankheiten.* 1902. Jena, Fischer Verlag.

- 55 Müller K, Ehlers S, Solbach W, Laskay T. Novel multi-probe RNase protection assay (RPA) sets for the detection of murine chemokine gene expression. *J.Immunol.Methods*. 2001; 249: 155-165
- 56 Nolan S, Burgess K, Hopper L, Braude S. - Acute respiratory distress syndrome in a community hospital ICU. - *Intensive Care Med*. 1997; 23: 530-538
- 57 Park Y, Lee SW, Sung YC. Cutting Edge: CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by up-regulating cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositide-3'-OH kinase pathway. *J.Immunol*. 2002; 168: 5-8
- 58 Petty TL, Ashbaugh DG. - The adult respiratory distress syndrome. Clinical features, factors influencing prognosis and principles of management. - *Chest*. 1971; 60: 233-239
- 59 Piantadosi CA, Schwartz DA. - The acute respiratory distress syndrome. - *Ann Intern Med*. 2004; 6: 68-70
- 60 Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998; 282: 2085-2088
- 61 Reynolds HN, McCunn M, Borg U, Habashi N, Cottingham C, Bar-Lavi Y. - Acute respiratory distress syndrome: estimated incidence and mortality rate in a 5 million-person population base. - *Crit Care (Lond)*. 1998; 1: 31-34
- 62 Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 1998; 95: 588-593
- 63 Roman M, Martin-Orozco E, Goodman JS, Nguyen MD, Sato Y, Ronaghy A, Kornbluth RS, Richman DD, Carson DA, Raz E. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat.Med*. 1997; 3: 849-854
- 64 Roupie E, Lepage E, Wysocki M, Fagon JY, Chastre J, Dreyfuss D, Mentec H, Carlet J, Brun-Buisson C, Lemaire F, Brochard L. Prevalence, etiologies and outcome of the acute respiratory distress syndrome among hypoxemic ventilated patients. SRLF Collaborative Group on Mechanical Ventilation. *Societe de Reanimation de Langue Francaise. Intensive Care Med*. 1999; 25: 920-929
- 65 Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N.Engl.J.Med*. 2005; 16: 1685-1693
- 66 Schuster. *Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen*. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2000
- 67 Schuster DP. - What is acute lung injury? What is ARDS? - *Chest*. 1995; 107: 1721-1726
- 68 Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J.Biol.Chem*. 1999; 274: 17406-17409

- 69 Schwartz DA, Quinn TJ, Thorne PS, Sayeed S, Yi AK, Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. *J.Clin.Invest.* 1997; 100: 68-73
- 70 Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* 1985; 150: 76-85
- 71 Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 1998; 28: 2045-2054
- 72 Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J.Immunol.* 1996; 157: 2116-2122
- 73 Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B. - Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. - *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 131: 3516-3521
- 74 Takenaka H, Maruo S, Yamamoto N, Wsocka M, Ono S, Kobayashi M, Yagita H, Okumura K, Hamaoka T, Trinchieri G, Fujiwara H. Regulation of T cell-dependent and -independent IL-12 production by the three Th2-type cytokines IL-10, IL-6, and IL-4. *J.Leukoc.Biol.* 1997; 61: 80-87
- 75 Thews G, Lungenatmung. In: Schmitz F., Thews G., Hrsg., *Physiologie des Menschen.* Berlin: Springer, 1995: 568-569
- 76 Thomsen GE, Morris AH. Incidence of the adult respiratory distress syndrome in the state of Utah. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1995; 152: 965-971
- 77 U.S.Department of Health and Human Services. U.S. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute. *Diseases and Conditions Index. Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS).* 1972.
- 78 Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* 1999; 401: 811-815
- 79 Valta P, Uusaro A, Nunes S, Ruokonen E, Takala J. - Acute respiratory distress syndrome: frequency, clinical course, and costs of care. - *Crit Care Med.* 1999; 27: 2367-2374
- 80 Villar J, Slutsky AS. The incidence of the adult respiratory distress syndrome. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1989; 140: 814-816
- 81 Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, Wader T, Tluk S, Liu M, Davis HL, Krieg AM. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur.J.Immunol.* 2004; 34: 251-262
- 82 Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 2000; 342: 1334-1349

- 83 Webster NR, Cohen AT, Nunn JF. - Adult respiratory distress syndrome--how many cases in the UK? - *Anaesthesia*. 1988; 43: 923-926
- 84 Weighardt H, Feterowski C, Veit M, Rump M, Wagner H, Holzmann B. Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. *J.Immunol*. 2000; 165: 4537-4543
- 85 Weighardt H, Heidecke CD, Westerholt A, Emmanuilidis K, Maier S, Veit M, Gerauer K, Matevossian E, Ulm K, Siewert JR, Holzmann B. Impaired monocyte IL-12 production before surgery as a predictive factor for the lethal outcome of postoperative sepsis. *Ann.Surg*. 2002; 235: 560-567
- 86 Yamada H, Ishii KJ, Klinman DM. Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit CpG-induced inflammation of the mouse lung. *Crit Care Med*. 2004; 32: 2045-2049
- 87 Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga T. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol.Immunol*. 1992; 36: 983-997
- 88 Yi AK, Chace JH, Cowdery JS, Krieg AM. IFN-gamma promotes IL-6 and IgM secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and oligodeoxynucleotides. *J.Immunol*. 1996; 156: 558-564
- 89 Yi AK, Chang M, Peckham DW, Krieg AM, Ashman RF. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J.Immunol*. 1998; 160: 5898-5906
- 90 Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J.Immunol*. 1999; 163: 1-5
- 91 Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J.Immunol*. 2002; 168: 554-561

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. A. Hoeft danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, erste wissenschaftliche Erfahrungen in einer molekularbiologisch orientierten Arbeitsgruppe zu sammeln.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Pascal Knüfermann, Herrn PD Dr. med Georg Baumgarten und Herrn Professor Dr. med. Christian Grohé für die freundliche Anleitung und gute wissenschaftliche Betreuung, zu jedem Zeitpunkt der Arbeit, sowie für die Bereitstellung der Laboratorien und Untersuchungsmaterialien.

Herrn Lars Gauglitz und Frau Angela Frintrup danke ich für das Korrekturlesen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Patrick Effertz, Herrn Dirk Böker, Herrn Markus Schwederski, Frau Heidi Stapel und allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden in den wissenschaftlichen Laboren der medizinischen Poliklinik und des physiologischen Instituts, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.