

**Auswirkungen der pharmakologischen Inhibition
des Toll-like Rezeptors 9 auf die
inflammatorische Zytokinproduktion *in vitro*
im Modell einer polymikrobiellen Sepsis**

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

Verena Maria Gielen

Bonn

2011

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Pascal Knüfermann

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Rainer Meyer

Tag der Mündlichen Prüfung: 19.09.2011

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

Direktor: Prof. Dr. med. A. Hoeft

Für meine Eltern und meinen Opa.

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis.....	8
2 Einleitung.....	11
2.1 Sepsis.....	11
2.1.1 Definition.....	11
2.1.2 Epidemiologie.....	14
2.2 Immunsystem und Mustererkennungsrezeptoren.....	14
2.3 Die Toll-like Rezeptoren.....	16
2.3.1 Der Toll-like Rezeptor 9 – Funktion.....	20
2.3.2 Der Toll-like Rezeptor 9 – Signaltransduktion.....	21
2.4 Immunostimulatorische DNA.....	24
2.5 Synthetische Oligonukleotide.....	26
2.5.1 Inhibitorische synthetische Oligonukleotide.....	28
2.6 Proinflammatorische Zytokine.....	32
2.7 Zielsetzung.....	34
3 Material und Methoden.....	35
3.1 Bezugsquellennachweis.....	35
3.1.1 Zelllinie.....	35
3.1.2 Geräte.....	35
3.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	36
3.1.4 Medien und Reagenzien.....	36
3.1.5 Thioate.....	37
3.1.6 Chloroquin.....	37
3.1.7 Kits.....	37
3.2 Methoden.....	38
3.2.1 Zellkultivierung.....	38
3.2.2 Zellzahlbestimmung.....	39
3.2.3 Isolation von murinen Darmbakterien.....	40

3.2.4 Bakterienzahlbestimmung.....	41
3.2.5 Stimulation der Zellen.....	41
3.2.6 Gabe der Reagenzien zur Inhibition der Zytokinexpression.....	42
3.2.7 Zellernte.....	43
3.2.8 Bestimmung von TNF- α mittels „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA).....	43
3.2.9 Bestimmung von IL-1 β und IL-6 mittels ELISA.....	46
3.2.10 Statistische Auswertung.....	46
4 Ergebnisse.....	47
4.1 Simulation einer polymikrobiellen Sepsis in vitro.....	47
4.2 Kontrolle der zu testenden Substanzen.....	49
4.3 Konzentrationsfindung.....	50
4.3.1 H154-Thioat	50
4.3.2 IRS954-Thioat	51
4.3.3 1612-Thioat	52
4.3.4 Chloroquin	53
4.4 H154-Thioat.....	54
4.4.1 Wirkung auf die TNF- α Produktion im Zeitverlauf.....	54
4.4.2 Wirkung auf die IL-6 Produktion im Zeitverlauf.....	56
4.4.3 Wirkung auf die IL-1 β Produktion im Zeitverlauf.....	57
4.5 IRS954-Thioat.....	58
4.5.1 Wirkung auf die TNF- α Produktion im Zeitverlauf.....	58
4.5.2 Wirkung auf die IL-6 Produktion im Zeitverlauf.....	59
4.5.3 Wirkung auf die IL-1 β Produktion im Zeitverlauf.....	60
4.6 1612-Thioat	61
4.6.1 Wirkung auf die TNF- α Produktion im Zeitverlauf.....	61
4.6.2 Wirkung auf die IL-6 Produktion im Zeitverlauf.....	62
4.6.3 Wirkung auf die IL-1 β Produktion im Zeitverlauf.....	63
4.7 Chloroquin.....	64
4.7.1 Wirkung auf die TNF- α Produktion im Zeitverlauf.....	64
4.7.2 Wirkung auf die IL-6 Produktion im Zeitverlauf.....	65

4.7.3 Wirkung auf die IL-1 β Produktion im Zeitverlauf.....	66
4.8 Substanzwirkung zum Zeitpunkt 6 h.....	67
4.9 Kombination von H154- und IRS954-Thioat.....	68
5 Diskussion.....	69
6 Zusammenfassung.....	75
7 Literaturverzeichnis.....	76
8 Danksagung.....	87

Abkürzungsverzeichnis

ACCP	American College of Chest Physicians
AP-1	Aktivatorprotein-1
APC	Antigenpräsentierende Zellen
Bcl	B-Zell-Lymphoma-Gen
CASP	Colon-Ascendens-Stent-Peritonitis
CD	„cluster of differentiation“
CG	Cytosin Guanosin
c-JNK	c- Jun-N-terminal-kinase
CLP	Zökale Ligatur und Punktion
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanosin
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonat-Wasser
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	„Enzyme-linked Immunosorbent Assay“
FKS	Fetales Kälberserum
HRP	Horseraddishperoxidase
HSV	Humanes Herpesvirus
ICE	„IL-1 beta converting enzyme“
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I κ B	„inhibitor of kappa B“
IKK	„inhibitory κ B kinase“
IL	Interleukin
iODN	inhibitorische Oligonukleotide
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF7	INF-Regulationsfaktor 7
LAM	Lipoarabinomannan
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
MAP-Kinasen	„mitogen activated protein kinases“
MCMV	Murines Cytomegalovirus

mDC	myeloide Dendritische Zellen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MKK6	„MAP-kinase-kinase-6“
MNAB	“membrane associated nucleic acid binding protein”
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
MOV	Multiorganversagen
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
MyD88	„myloid differentiation marker 88“
NFκB	„nuclear factor κB“
NK	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotid
p38	eine MAP-Kinase
p50 und p65	Untereinheiten von „nuclear factor κB“
PAMP	„pathogen associated microbial pattern“
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pDC	plasmazytoide dendritische Zellen
PIRO	Akronym für „predisposition“, „insult / infection“, „response“, „organ dysfunction“
Poly-G-Sequenz	Poly-Guanin-Sequenz
PRR	„pattern recognition receptor“
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	Respiratory syncytial virus
RT	Raumtemperatur
SARM	„selective androgen receptor modulator“
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SIRS	„systemic inflammatory response syndrome“ (Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom)
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SOFA-Score	„Sequential Organ Failure Assessment-Score“
SR-A	Scavenger Rezeptor-A
TAB	„TAK1-binding protein“
TAK1	„transforming growth factor-β-activated kinase 1“
TIRAP = Mal	„TIR-domain-containing adapter protein“

TIR-Domäne	Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TLR-D	Toll-like Rezeptor-defizient
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNM-Klassifikation	Tumor, Lymphknoten, Metastase; internationales Klassifikationssystem der „Union internationale contre le cancer“
TRAF6	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6
TRAM = TICAM-2	„TRIF-related adapter molecule“
TREM-2	“Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells 2”
TRIF = TICAM-1	„TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β “
WNV	West Nile virus
WT	Wildtypmäuse

2 Einleitung

2.1 Sepsis

2.1.1 Definition

Der Begriff „Sepsis“ wurde bereits von Hippokrates (ca. 460-370 v Chr.) eingeführt und leitet sich von dem griechischen $\sigma\eta\pi\omega$ („faul machen“) ab. Im Jahr 1914 formulierte W. Schottmüller die klassische Definition der Sepsis beruhend auf einem primären Sepsisherd und einer hiervon ausgehenden hämatogenen Streuung (Schottmüller, 1914). Die heute gültige Definition der Sepsis geht auf die Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) von 1992 (ACCP/SCCM ,1992; Bone et al., 1992) zurück. Es wurde der Begriff „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) eingeführt als eine allgemeine, entzündliche Abwehrreaktion auf nicht-infektiöse Ursachen, wie zum Beispiel Trauma, hämorrhagischer Schock oder Pankreatitis. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei einer Sepsis um ein SIRS, das durch eine mikrobiologische Infektion verursacht wird. Ein SIRS kann bei Erfüllung mindestens zweier Kriterien wie Tachykardie, Hypo- oder Hyperthermie, Tachypnoe, Leukozytose oder Leukopenie diagnostiziert werden (siehe Tabelle 1). Eine Sepsis wird als schwer angesehen beim Auftreten akuter, lebensbedrohlicher Organdysfunktionen. Als septischer Schock wird ein deutlicher Blutdruckabfall trotz adäquater Volumensubstitution bezeichnet, der zu einer Minderperfusion von Organen führt und in der Regel der Gabe von Katecholaminen bedarf (Bone, 1991). Eine schwerwiegende Komplikation des septischen Krankheitsverlaufes stellt das Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) dar.

Bald nach Einführung dieser neuen Definitionen in die klinische Praxis wurde deutlich, dass mehr als zwei Drittel der Patienten einer Intensivstation die SIRS-Kriterien erfüllten (Rangel-Frausto et al., 1995). Auch wurde kritisiert, dass sich die Krankheitsbilder SIRS und Sepsis anhand der vorgeschlagenen Kriterien nicht eindeutig voneinander abgrenzen ließen. Auf diesem Hintergrund fand im Jahr 2001 die „International Sepsis Definitions Conference“ statt. Dort kam man zu dem Schluss, dass die alten Definitionen prinzipiell nützlich sowohl für den Kliniker als

auch den Wissenschaftler sind und weiterhin benutzt werden sollen, sie jedoch kein präzises Staging oder eine Aussage über die Prognose eines Sepsispatienten zulassen. Die Liste der klinischen Kriterien und Laborparameter zur Diagnosesicherung der Sepsis wurde erweitert um Faktoren wie Hämodynamische Instabilität, Gerinnungsstörungen, erhöhtes Procalcitonin oder erhöhtes Kreatinin. Des Weiteren wurde in Analogie zu der TNM-Klassifikation maligner Tumoren ein Klassifikationssystem für die Sepsis vorgeschlagen, das so genannte PIRO-System. Dieses Verlaufs- und Prognosesystem stratifiziert die Patienten auf der Grundlage von Prädisposition (P), Infektion (I), inflammatorischer Reaktion (R) und Organdysfunktion (O) nach ihrem Risiko. Dabei werden unter Prädisposition genetische Variationen, Vor- und Begleiterkrankungen sowie religiöse und kulturelle Faktoren subsumiert, die einen Einfluss auf Verlauf und Ausgang der Sepsis haben (Levy et al., 2003). Die Art der Infektion soll charakterisiert werden, bisher durch die Untersuchung von Blutkulturen und Resistenzbestimmung von Keimen, in Zukunft durch Bestimmung mikrobieller Produkte wie bakterieller DNA oder Toxine. Als schwierig stellt sich die Evaluation der Reaktion des Organismus auf die Inflammation dar und erfolgt z.Zt. am ehesten durch die Bestimmung von Entzündungsmarkern wie Procalcitonin, Interleukin-6 oder TREM-2, jedoch sind diese sog. „Sepsismarker“ weiterhin Gegenstand lebhafter Diskussion (Brunkhorst, 2008). Das Ausmaß der Organdysfunktion ist entscheidend für die Prognose der Sepsis und kann mit Hilfe des „Sequential Organ Failure Assessment“ (SOFA)-Scores evaluiert werden (Vincent et al., 1998). Das PIRO-System und die oben genannten Definitionen und Kriterien müssen in der Klinik und der Forschung allerdings zunächst weiter implementiert werden. Die Akzeptanz, hier nach einheitlichen Kriterien vorzugehen, ist noch immer unbefriedigend (Calandra et al., 2005).

Entität	Definition
SIRS	<p>Systemisch-entzündliche Reaktion auf nicht-infektiöse Ereignisse, charakterisiert durch zwei oder mehr der folgenden Parameter:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) Körpertemperatur > 38°C oder < 36°C, b) Herzfrequenz > 90/min, c) Atemfrequenz > 20/min oder $p_a\text{CO}_2 < 32\text{mmHg}$, d) Leukozyten > 12.000/mm³ oder < 4.000/mm³ oder > 10% unreife Formen
Sepsis	<p>Systemische Immunantwort auf eine Infektion.</p> <p>Eine Sepsis liegt vor, wenn zwei oder mehr der oben genannten Symptome durch eine Infektion bedingt sind oder eine Infektion vermutet wird.</p>
Schwere Sepsis	<p>Eine Sepsis wird als schwer bezeichnet, wenn sie mit Organdysfunktion, Minderperfusion oder Hypotension assoziiert ist. Minderdurchblutung und Durchblutungsstörung können beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf: Laktatazidose, Azidose, Oligurie oder eine akute Änderung der Bewusstseinslage.</p>
Septischer Schock	<p>Es liegt eine sepsis-induzierte Hypotension trotz adäquater Volumensubstitution vor, welche den Einsatz von Vasopressoren nötig macht. Sie geht einher mit Hypoperfusions- oder Organdysfunktionszeichen.</p>
Multiorgan-dysfunktionssyndrom (MODS)	<p>Es handelt sich um eine schwer veränderte Organfunktion bei Akutkranken, bei der die Homöostase ohne Intervention nicht mehr aufrechterhalten werden kann.</p>

Tabelle 1: Definition von SIRS, Sepsis, schwerer Sepsis, septischen Schock und MODS nach der Konsensuskonferenz von 1991 (ACCP/ SCCM, 1992)

2.1.2 Epidemiologie

Als dritthäufigste Todesursache in Deutschland nimmt die Sepsis einen hohen Stellenwert ein und ist für 60.000 Todesfälle pro Jahr verantwortlich (Brunkhorst, 2006). Das Kompetenznetzwerk Sepsis geht davon aus, dass in Deutschland jährlich 79.000 Menschen an einer Sepsis und 75.000 Menschen an einer schweren Sepsis erkranken. Dies entspricht einer Zahl von 116 bzw. 110 Erkrankten pro 100.000 Einwohner.

Die Prävalenz der Sepsis auf deutschen Intensivstationen beträgt 12,4% mit einer Krankenhausmortalität von 48,4, die Prävalenz der schweren Sepsis liegt bei 11% und ist mit einer Mortalität im Krankenhaus von 55,2% verbunden (Engel et al., 2007). Die direkten Kosten der intensivmedizinischen Behandlung werden auf 1,77 Milliarden Euro geschätzt. Somit wird rund ein Drittel des intensivmedizinischen Budgets allein für die Therapie der Sepsis ausgegeben (Graf et al., 2007).

In den letzten Jahren kann ein Anstieg der Inzidenz der Sepsis beobachtet werden. Dieser wird auf die zunehmende Anzahl immunsupprimierter Patienten, den verbreiteten Einsatz von Fremdmaterialimplantationen sowie das erhöhte Auftreten multiresistenter Erreger durch inadäquaten Gebrauch von Antibiotika zurückgeführt. Die Zunahme der Inzidenz wird mit 1,5% pro Jahr beziffert (Angus et al., 2001).

2.2 Immunsystem und Mustererkennungsrezeptoren

Das Immunsystem der Vertebraten besteht aus zwei Komponenten, die traditionell zum einen als die angeborene Immunität und zum anderen als die erworbene Immunität bezeichnet werden. In der Vergangenheit hat man diese als zwei vollständig voneinander getrennte Systeme beschrieben, die unterschiedliche Mechanismen der Immunantwort induzieren und verwenden. Trotz ihrer unterschiedlichen Arbeitsweise agieren beide Systeme jedoch gemeinsam und sind durch eine Vielzahl von Signalkaskaden und Mediatoren auf das Engste miteinander verbunden; erst die Synergie beider Systeme ermöglicht eine intakte und effektive Immunabwehr.

Die erworbene Immunität wird durch B- und T-Lymphozyten und deren Antigenrezeptoren, die durch somatische Rekombination diversifiziert sind, repräsentiert. Sie können erst nach einer

Anlaufphase und klonaler Expansion aktiv werden. Dann sind sie jedoch in der Lage, eine große Anzahl antigenspezifischer B- und T-Zellklone zu erzeugen um Pathogene spezifisch zu bekämpfen. Außerdem wird durch die Produktion von Gedächtniszellen eine wirksame und lang anhaltende Immunität gegenüber bestimmten antigentragenden Pathogenen erreicht. Das erworbene Immunsystem hat sich in der Evolution zu einem späteren Zeitpunkt entwickelt als das angeborene. Deshalb besitzen nur höher entwickelte Vertebraten dieses komplexe Abwehrsystem.

Die angeborene Immunität stellt hingegen eine schnelle und frühe Barriere gegen eindringende Krankheitserreger dar und schützt den Organismus durch Begrenzung der Infektion, bis die Abwehrmechanismen der erworbenen Immunität einsetzen. Es ist anzunehmen, dass 99% aller Infektionen allein durch die angeborene Immunität beherrscht werden (Hörner et al., 2004). So wie das erworbene Immunsystem besteht auch das angeborene sowohl aus einer humoralen als auch aus einer zellulären Komponente. Wichtige Vertreter der humoralen Komponente sind vor allem das Komplementsystem, aber auch Lysozym und Akut-Phase-Proteine. Die zelluläre Komponente besteht aus einer Vielzahl von Zellen, die hauptsächlich aus der myeloischen Stammzellreihe hervorgehen. Wichtigste Vertreter sind die mononuklearen Zellen (Makrophagen, Dendritische Zellen), die polymorphkernigen Phagozyten (Neutrophile Granulozyten), die Natürlichen Killerzellen (NK) und die Mastzellen. Ihre Aufgabe besteht darin, Mikroorganismen als Krankheitserreger zu erkennen, zu phagozytieren, den Lymphozyten Antigene zu präsentieren und Zytokine freizusetzen (Johnston, 1989). Das angeborene Immunsystem ist somit wesentlich verantwortlich für die Fremd-Eigendiskrimination, die aufgrund der großen Heterogenität mikrobieller Pathogene und ihrer hohen Mutationsrate eine komplexe Aufgabe darstellt. Der Antwort auf die Frage, wie das angeborene Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen unterscheidet, konnte durch die Entdeckung von „pathogen associated microbial pattern“ (PAMP) und „pattern recognition receptors“ (PRR, Mustererkennungsrezeptoren) näher gekommen werden. Durch ein System dieser Mustererkennungsrezeptoren begegnet die angeborene Immunität einem Großteil der Erregerantigene. So besitzen Bakterien, Pilze und Viren invariable, phylogenetisch konservierte Strukturen, so genannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster, die keiner Variation unterliegen, da eine Mutation in diesem Bereich tödlich für den Keim wäre. Es handelt sich also

um für das Überleben der Mikroorganismen essentielle Strukturen, die nur bei diesen und nicht im Wirt vorkommen, wodurch sie der angeborenen Abwehr die Unterscheidung zwischen pathogenen und körpereigenen Merkmalen erlauben. Wichtige PAMP sind das Lipopolysaccharid von gramnegativen Bakterien, Lipoteichonsäure von grampositiven Bakterien und bakterielle DNA (Krieg et al., 1995; Messina et al., 1991).

2.3 Die Toll-like Rezeptoren

Die PRR lassen sich funktionell in drei Klassen unterteilen: sezernierte, endozytierende und signaltransferierende Rezeptoren (Medzhitov und Janeway, 2000). Zu der Gruppe der signaltransferierenden Rezeptoren gehören vor allem die Toll-like Rezeptoren (TLR), die Abwehrzellen aktivieren und eine akute Entzündungsreaktion hervorrufen. Mit Hilfe von Signaltransduktionskaskaden leiten sie die Information der Pathogenerkennung ins Innere der Zelle und induzieren dort die Expression verschiedener Gene der Immunantwort (Medzhitov und Janeway, 1997).

Das Protein „Toll“ wurde zunächst bei der Fruchtfliege (*Drosophila* sp.) beschrieben (Anderson und Nüsslein-Volhard, 1984). 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. Fehlt das entsprechende Toll-Protein sterben die Fruchtfliegen an Pilzinfektionen. Im Jahre 1997 wurde das erste humane Homolog von Toll beschrieben, das analog als Toll-like Rezeptor bezeichnet wurde (Medzhitov et al., 1997). Bis heute wurden im humanen Genom 10, im murinen Genom 12 verschiedene TLR identifiziert und einige genauer charakterisiert (Zhang et al., 2004). Die transmembranären TLR besitzen zwei charakteristische Domänen: die extrazelluläre Domäne, die für das Erkennen der PAMP verantwortlich ist, und die von Insekten bis zu Vertebraten hoch konservierte intrazelluläre Domäne. Letztere gleicht der intrazellulären Domäne des Interleukin-1-Rezeptors, weshalb sie als Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne bezeichnet wird (Gay und Keith, 1991). TLR und Interleukin-1-Rezeptor unterscheiden sich jedoch durch ihre extrazellulären Domänen. Der Interleukin-1-Rezeptor besitzt Immunglobulin-Domänen, wohingegen der TLR über einen Abschnitt mit sich wiederholenden Leucin-Motiven verfügt, der hauptsächlich der Protein-

Protein-Interaktion dient (Kobe und Kajava, 2001). Obwohl dieser strukturelle Aufbau allen TLR gemein ist, unterscheiden sie sich doch beträchtlich in ihren Signaltransduktionswegen. Von den zytoplasmatischen Adaptermolekülen, die an die TIR-Domäne des jeweiligen Rezeptors binden und Signale in das Zellinnere weiterleiten, sind bisher fünf beschrieben: MyD88 („myloid differentiation marker 88“), TIRAP („TIR-domain-containing adapter protein“, auch Mal, „MyD88 adapter-like“, genannt), TRIF („TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β “, auch als TICAM-1 bezeichnet), TRAM („TRIF-related adapter molecule“, auch TICAM-2 genannt) und der negative Regulator SARM („selective androgen receptor modulator“) (O’Neill und Bowie, 2007). Jeder TLR hat sein eigenes Zell- und Gewebeverteilungsmuster und bindet mehr oder weniger spezifisch ein pathogenassoziiertes Molekül, weshalb unterschiedliche Pathogenarten erkannt werden können. So finden sich in Monozyten vornehmlich TLR2 und TLR4 und fast kein TLR9, wohingegen plasmazytoide Dendritische Zellen (pDC) kein TLR2 und TLR4, dafür aber relativ große Mengen TLR7 und 9 exprimieren (Hornung et al., 2002). Die Bereitstellung der TLR in der Zelle erfolgt auf unterschiedlichen Wegen. Die TLR1, 2, 4, 5 und 6 befinden sich auf der Zelloberfläche und erkennen vornehmlich Membranbestandteile wie Lipide, Lipoproteine und Proteine, während sich die TLR3, 7, 8 und 9 in intrazellulären Kompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum, Endosomen, Lysosomen und Endolysosomen befinden, wo sie mikrobielle Nukleinsäuren erkennen (Ahmad-Nejad et al., 2002; Latz et al., 2004; Matsumoto et al., 2003; Takeuchi und Akira, 2010; Yoneyama und Fujita, 2010). Die auf der Zelloberfläche lokalisierten TLR werden nach Kontakt mit ihren jeweiligen Liganden als Phagosomen abgeschnürt. In diesen findet die weitere Signalkaskade statt (Underhill et al., 1999). Die Erkennung spezifischer Liganden führt im Allgemeinen zur Dimerisierung zweier TLR (Aderem et al., 2000). Die meisten PAMP werden in Form von TLR-Homodimeren erkannt, lediglich die Rezeptoren 1, 2 und 6 agieren als Heterodimere (Ozinsky et al., 2000). Einige TLR benötigen Co-Rezeptoren. So verwenden TLR4, TLR7 und TLR9 das Zelloberflächenmolekül CD14 als Co-Rezeptor (Baumann et al., 2010; Jiang et al., 2000).

Die Aktivierung der TLR und die sich anschließende durch Adaptermoleküle vermittelte Peptidkaskade führen zu einer Aktivierung der Zelle. Es werden zwei Formen der Aktivierung unterschieden: MyD88-abhängig und MyD88-unabhängig (Takeda et al., 2004). Den MyD88-abhängigen Weg nutzen alle TLR-Mitglieder außer TLR3. Gemeinsamer Effekt beider

Aktivierungswege ist die Translokation des Transkriptionsfaktors nuclear-factor-kappa-B (NF κ B) in den Zellkern und die vermehrte Transkription proinflammatorischer Zytokine, z. B. Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) (Hayashi et al., 2001).

TLR4 beispielsweise erkennt Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der Membran gramnegativer Bakterien. Nach Bindung von LPS führt die Aktivierung von TLR4 zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine. Die erhöhte Anfälligkeit TLR4-defizienter Mäuse für Infektionen mit gramnegativen Bakterien (Iwasaki und Medzhitov, 2004; Takeda et al., 2003) verdeutlicht die wichtige Funktion der TLR im Rahmen der Immunabwehr.

Rezeptor	Lokalisation	Liganden (PAMP)	Im Komplex mit
TLR1	Plasmamembran	Triacyl Lipopeptide (Bakterien und Mykobakterien)	TLR2
TLR2	Plasmamembran	Lipoproteine/ Lipopeptide, LAM (Mykobakterien), Hämagglutinin (Masernvirus), Glykoinositolphospholipide (Trypanosoma cruzi)	TLR1 und TLR6
TLR3	Endosom	einzelsträngige RNA (WNV), doppelsträngige RNA (Reovirus), RSV, MCMV	
TLR4	Plasmamembran	LPS (Gram-negative Bakterien), Mannan (Candida), Hüllenproteine (RSV)	
TLR5	Plasmamembran	Flagellin (Bakterien)	
TLR6	Plasmamembran	Diacyl Lipopeptide (Mykoplasma)	TLR2
TLR7	Endsom	einzelsträngige virale RNA (Influenzavirus)	
TLR8	Endosom	einzelsträngige virale RNA	
TLR9	Endosom	doppelsträngige virale DNA (HSV, MCMV), CpG-Motive von Bakterien und Viren, Hämozoïn (Plasmodium)	
TLR10	unbekannt	unbekannt	

Tabelle 2: Toll-like Rezeptoren mit Lokalisation, bekannten Liganden und Komplexbildner (modifiziert nach Kumar et al., 2009; Kumagai et al., 2008). LAM = Lipoarabinomannan; WNV = West Nile virus; RSV = Respiratory syncytial virus; MCMV = Murines Cytomegalovirus; LPS = Lipopolysaccharid; HSV = Humanes Herpesvirus

2.3.1 Der Toll-like Rezeptor 9 – Funktion

In Untersuchungen an TLR9-defizienten Mäusen konnten Hemmi und Mitarbeiter im Jahr 2000 zeigen, dass TLR9 der spezifische und notwendige Rezeptor für bakterielle DNA ist. TLR9-defiziente Mäuse waren resistent gegenüber dem tödlichen Effekt der bakteriellen DNA und zeigten keinerlei Erhöhung der Serumspiegel proinflammatorischer Zytokine. Hemmi schloss daraus, dass es sich bei TLR9 um diejenige Struktur des Immunsystems handeln muss, die für die Unterscheidung zwischen bakterieller und Eigen-DNA verantwortlich ist (Hemmi et al., 2000). So spielt TLR9 zum Beispiel eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Infektionen durch *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae* und *Brucella melitensis* (Bafica et al., 2005; Copin et al., 2007; Lee et al., 2007). Des Weiteren zeigte sich, dass TLR9 nicht nur essentiell für die Produktion proinflammatorischer Zytokine ist, sondern ebenfalls eine Rolle für die Induktion von T-Helferzellen und der Proliferation von B-Zellen spielt, also nicht nur Effektoren der angeborenen, sondern ebenfalls der erworbenen Abwehr stimuliert. Außerdem erkennt TLR9 auch virale DNA, da diese häufig reich an unmethylierten CpG-DNA-Sequenzen ist (siehe unten). Die DNA von Herpes simplex Typ 1 und 2, von murinem Zytomegalievirus und vom Adenovirus wird durch TLR9 auf pDC erkannt, wodurch es zu einer Aktivierung dieser Zellen mit konsekutiver Produktion von Interferonen und anderen Zytokinen kommt (Lund et al., 2003; Krug et al., 2004 a; Krug et al., 2004 b; Tabeta et al., 2004; Zhu et al., 2007). Neben DNA erkennt TLR9 auch das so genannte Malariapigment Hemozoin (Coban et al., 2005). So konnte gezeigt werden, dass TLR9 eine Rolle in der Pathogenese von zerebraler Malaria spielt (Coban et al., 2007).

Die Zellpopulationen, die TLR9 exprimieren, können speziesspezifisch variieren. So exprimieren in Mäusen myeloide Immunzellen (einschließlich Monozyten, Makrophagen und myeloiden Dendritischen Zellen) TLR9, wohingegen beim Menschen in diesen Zellen keine oder nur eine geringe Expression nachgewiesen werden konnte (Bauer et al., 2001 b; Hornung et al., 2002; Kadowaki et al., 2001). Im Menschen konnte eine ausgeprägte Expression von TLR9 bisher nur in humanen B-Zellen und pDC nachgewiesen werden. Dies führte zu der Annahme, dass die Aktivierung der anderen nicht TLR9-exprimierenden Immunzellen indirekt durch die TLR9-vermittelte Produktion von Zytokinen und Chemokinen hervorgerufen wird (Hornung et al.,

2002). Dieses schmale Expressionsmuster von TLR9 schafft eine gute Voraussetzung für eine spezifische Therapie mit TLR9-Liganden.

2.3.2 Der Toll-like Rezeptor 9 – Signaltransduktion

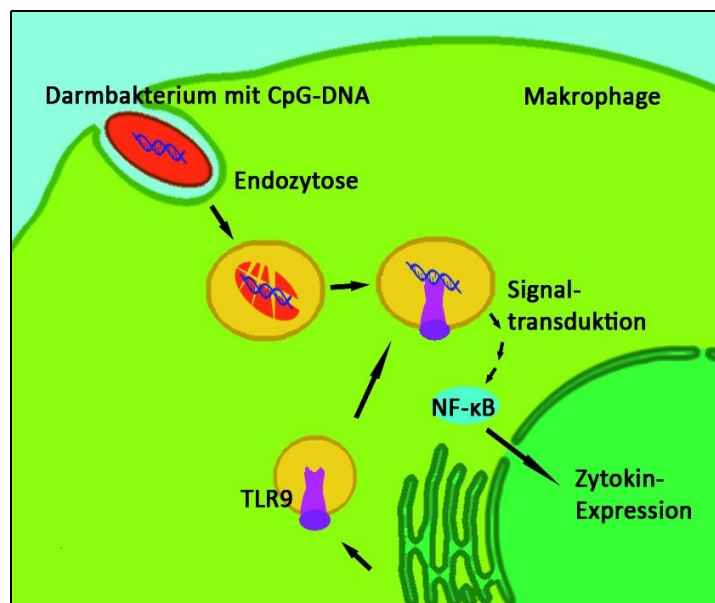


Abbildung 1: Grobschematische Darstellung der intrazellulären Vorgänge in einem Makrophagen im Rahmen der TLR9-Aktivierung durch bakterielle DNA

Durch Endozytose nimmt der Makrophage ein Darmbakterium auf, das aufgrund des sauren pH-Werts innerhalb des Endosoms zersetzt wird. Vom endoplasmatischen Retikulum wird ein Lysosom, das TLR9 enthält, abgeschnürt und fusioniert mit dem die bakterielle DNA enthaltendem Endosom. Durch die Bindung der DNA an TLR9 wird eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst (siehe Abbildung 2), an deren Ende die Translokation des Transkriptionsfaktors NFκB in den Nucleus steht, wo dieser die Expression proinflammatorischer Zytokine induziert. *Erklärung der Abkürzungen im Text*

Beim TLR9 handelt es sich um einen membranständigen Rezeptor, der im intrazellulären Membrankompartiment lokalisiert ist, wie dem endoplasmatischem Retikulum, Endosomen und Lysosomen (Latz et al., 2004). In ruhenden Zellen befindet sich TLR9 in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums. Wie andere Transmembranrezeptoren verfügt er über eine leucinreiche Domäne, einen transmembranären Teil und eine TIR-Domäne. Die leucinreiche

Domäne befindet sich an der Innenseite des jeweiligen membranumschlossenen Kompartiments, während die TIR-Domäne auf der zytosolischen Seite der Membran lokalisiert ist. Der Ligand von TLR9 ist bakterielle DNA. Kommt es zur Zellaktivierung im Sinne einer Klathrin-abhängigen Internalisierung von mikrobieller DNA in ein lysosomales Kompartiment, wird TLR9 vom endoplasmatischen Retikulum ebenfalls zu den Lysosomen transferiert um dessen Bindung an die CpG-DNA zu ermöglichen (Ahmad-Nejad et al., 2002). TLR9 kann auf zwei verschiedenen Wegen vom endoplasmatischen Retikulum in das lysosomale Kompartiment gelangen: einmal durch einen Umweg über die Plasmamembran und anschließende Endozytose oder aber auf direktem Weg durch Fusion von endoplasmatischen Retikulum mit Endosomen (Latz et al., 2004). Der direkte Weg wird durch das Transportprotein UNC93b1 ermöglicht (Kim et al., 2008). Nach Erreichen des Endosoms wird TLR9 durch Spaltung zu einem funktionsfähigen Rezeptor (Ewald et al., 2008). Der Kontakt mit bakterieller DNA bewirkt eine Konformationsänderung des als Homodimer vorliegenden TLR9, so dass sich die zytoplasmatischen TIR Domänen einander annähern (Latz et al., 2007). Dies erlaubt die Rekrutierung von MyD88 (Medzhitov et al., 1998). Dieses Adapterprotein tritt über seine C-terminale TIR-Domäne mit der intrazytoplasmatische TIR-Domäne von TLR9 in Wechselwirkung. An der N-terminalen sogenannten „Todesdomäne“ von MyD88 (zuerst bei Proteinen gefunden, die in Apoptoseprozesse involviert sind) lagern sich die Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase (IRAK) 1 und 4 an. Letztere scheint für die TLR9-vermittelte Zytokinfreisetzung essentiell zu sein (Kawagoe et al., 2007) und phosphoryliert IRAK1, wodurch es zu einer Komplexbildung mit TRAF6 (Tumor Nekrose Faktor Rezeptor assoziierter Faktor 6) kommt. Dieser Komplex, gebildet von IRAK 1 und 2 sowie TRAF6, interagiert mit einem weiteren Komplex, bestehend aus TAK1 (transforming growth factor-activating-kinase-1) und TAB (TAK1-binding protein) 1, 2 und 3. Die Interaktion induziert die Aktivierung und Phosphorylierung der TAK1 wodurch es zur Aktivierung der „inhibitory- κ B-kinases“ (IKK) kommt. Inaktive IKK halten den Transkriptionsfaktor NF κ B im Zytoplasma. Die Phosphorylierung des IKK-Komplexes, bestehend aus IKK α und $-\beta$ sowie IKK γ , führt nun zur Degradation von I κ B (inhibitory κ B) und konsekutiver Freisetzung von NF κ B (bestehend aus den beiden Untereinheiten p50 und p56), das nun in den Zellkern translozieren kann (Akira, 2009). Im Zellkern reguliert NF κ B die Transkription proinflammatorischer Zytokine (Baeuerle und Baltimore, 1996).

NF- κ B nimmt eine Schlüsselrolle in der Aktivierung von Zytokinen und Chemokinen ein, weshalb die Promoterregionen der meisten inflammatorischen Zytokine und Chemokine eine Bindungsstelle für dieses Protein aufweisen. Da es jedoch auch Gene gibt, die keine NF κ B-Bindungsstelle in ihrer Promotorregion besitzen und deren Expression dennoch durch CpG-DNA induziert wird, muss es noch einen alternativen Signaltransduktionsweg geben. In diesem aktiviert TRAF6 die „MAP-kinase-kinase-6“ (MKK6). Dies führt zur Aktivierung der „mitogen activated protein kinases“ (MAP-Kinasen) „c-Jun-N-terminal-kinase“ (c-JNK) und p38, wodurch der Transkriptionsfaktor „Activating Protein“ (AP-1) aktiviert wird und in den Zellkern wandert. Man nimmt an, dass dieser die Gentranskription in mit CpG-DNA behandelten Zellen induziert (Yi und Krieg, 1998). Beide Transkriptionsfaktoren – NF κ B und AP-1 - sind für die Expression spezieller Gene verantwortlich, die Interferone und inflammatorische Zytokine kodieren.

In pDC induziert die Aktivierung von TLR7 oder TLR9 die Produktion von Typ I Interferon durch die direkte Assoziation von MyD88 mit IRF7 (IFN-Regulationsfaktor 7) (Blasius und Beutler, 2010; Kawai et al., 2004) An dieser Interaktion sind außerdem IRAK4 und TRAF6 beteiligt (Honda et al., 2004), wobei die Ubiquitinligaseaktivität von TRAF6 für die IRF7-Aktivierung notwendig ist.

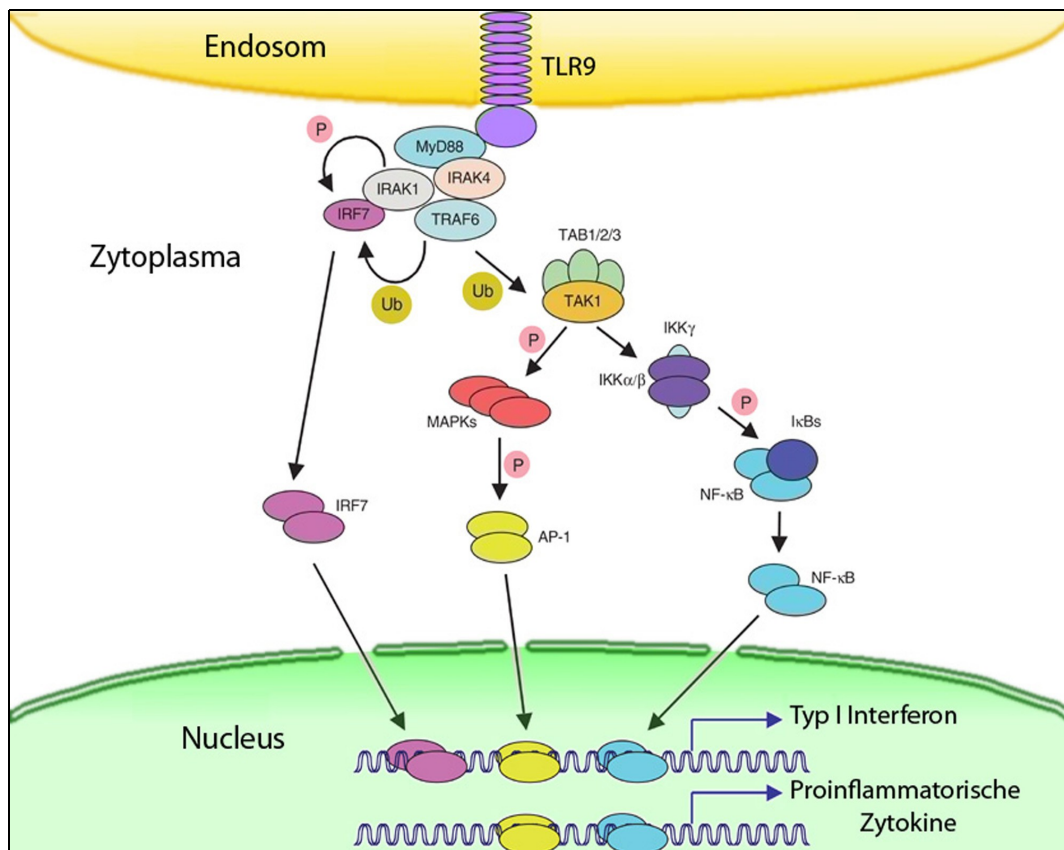


Abbildung 2: TLR9-Signaltransduktionsweg (modifiziert nach Kawai und Akira, 2006) *Erklärung der Abkürzungen im Text*

2.4 Immunostimulatorische DNA

DNA wurde bislang vor allem als biologischer Speicher für die Vielzahl der Gene des Erbgutes betrachtet. Der Gedanke, dass DNA auch als Antigen fungieren könnte, kam bei Untersuchungen autoimmunologischer Erkrankungen wie dem Systemischen *Lupus Erythematoses* (SLE) auf (Emlen et al., 1986). Tokunaga und Mitarbeiter zeigten, dass DNA Fraktionen von Mykobakterien ein ausreichend immunstimulatorisches Potential besitzen, um NK zu aktivieren und deren INF γ -Produktion zu erhöhen (Tokunaga et al., 1984). Die Beobachtung, dass ausschließlich bakterielle DNA und nicht Vertebraten-DNA eine immunologische Antwort auslöst (Messina et al., 1991) warf die Frage auf, welche Strukturen der DNA hierfür verantwortlich sind. Tokunaga und Mitarbeiter konnten diese Frage beantworten, indem sie synthetische DNA-Abschnitte herstellten. Sie erarbeiteten Oligonukleotide, die aus einem zentralen Palindrom mit einem CG-Dinukleotid, einem so genannten CpG-Motiv (Abfolge eines Cytidin-Guanosin, die über eine

Phosphatbindung verknüpft sind) bestehen. Bakterien codieren CG-Dinukleotide in der zu erwartenden statistischen Häufigkeit von 1:16 in ihrem Genom. In Eukaryonten jedoch ist die Häufigkeit von CG-Dinukleotiden etwa 20-mal geringer. Eukaryonten weisen also eine so genannte CG-Suppression auf. Zusätzlich sind bei diesen die Zytosinbasen zu 80% innerhalb des CG-Dinukleotids im Gegensatz zu Bakterien an der Position 5 methyliert, wodurch sie ihre immunostimulatorische Wirkung verlieren (Krieg et al., 1995). Somit stellen unmethylierte CG-Dinukleotide ein optimales Erkennungsmuster für die Unterscheidung von bakterieller und Vertebraten DNA dar. 1995 konnte Krieg demonstrieren, dass eine optimale B-Zell-Aktivierung einer bestimmten Sequenz vor und nach dem CpG-Motiv bedarf, nämlich zweier 5'-Purinbasen vor und zweier 3'-Pyrimidinbasen nach dem CG-Dinukleotid. Das am stärksten stimulierende Hexamer in Mäusen ist GACGTT, wohingegen humane Zellen besser auf das Kern-Motiv GTCGTT reagieren (Bauer et al., 2001 b). Die stimulatorische Potenz hängt also auch von dem speziesspezifischen Kontext ab, in dem das CpG-Motiv steht. Den CG-Dinukleotiden in eukaryonter DNA gehen meist nicht-stimulatorische Sequenzen voraus.

CpG-DNA hat zahlreiche immunregulatorische Effekte. In B-Zellen führt die Stimulation mit CpG-Motiven zu einer Zellproliferation. Hierbei werden bis zu 95% der B-Zellen dazu veranlasst, in den Zellzyklus einzutreten (Krieg et al., 1995). Auch die Sekretion von Zytokinen wie Interleukin-6 (IL-6), -10 und -12 wird induziert, wodurch wiederum die Sekretion von Immunglobulinen (IgM) angeregt wird (Redford et al., 1998; Yi et al., 1996 b). Eine Steigerung der Expression von kostimulatorischen Molekülen, wie MHCII, CD40, CD54 und CD86 auf der Oberfläche humaner B-Zellen nach Stimulation mit CpG-DNA konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Hartmann et al., 2000). Des Weiteren kann CpG-DNA den programmierten Zelltod in B-Zellen verhindern. Dieser Schutz vor Apoptose geht einher mit der erhöhten Synthese von Zellzyklus kontrollierenden Proteinen wie Bcl-2 und Bcl-x1 (Yi et al, 1996 a).

Insgesamt ist davon auszugehen, dass CpG-DNA in B-Zellen eine potente, Th1-dominierte Immunantwort hervorruft. So wurde gezeigt, dass bestimmte CpG-Motive die Immunglobulin (Ig)-Produktion in murinen B-Lymphozyten in die Richtung von TH1-spezifischen Ig-Isotypen (IgG2a, IgG2b und IgG3) lenken und gleichzeitig TH2-spezifische Isotypen unterdrücken (Lin et al., 2004).

Eine weitere wichtige Wirkung von CpG-DNA ist die Stimulation Antigenpräsentierender Zellen (APC). Unter diesen stellen die Dendritischen Zellen die bedeutsamste Gruppe dar. Sie sind die Nahtstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, werden im humanen Immunsystem neben den B-Zellen lediglich die pDC direkt durch CpG-DNA aktiviert, nicht aber myeloide Dendritische Zellen (mDC) (Hornung et al., 2002). PDC reagieren auf Stimulation mit CpG-Motiven mit der Sekretion von Interleukinen, wie IL-6, IL-8 und IL-12, sowie der Produktion von Typ1 Interferon (IFN-alpha and IFN-beta) (Bauer et al., 2001 a; Krug et al., 2001). Interferon führt zu einer Ausreifung der antigenpräsentierenden Zellen und in Zusammenarbeit mit anderen Chemo- und Zytokinen kommt es zu weiteren Effekten wie NK-Aktivierung und Hochregulation von Fc-Rezeptoren auf Effektorzellen wie Granulozyten, die eine erhöhte Wanderungs- und Phagozytoseaktivität zeigen (Krieg, 2002). In Makrophagen induziert CpG-DNA die Expression kostimulatorischer Oberflächenmarker und bedingt die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF- α , IL-6 und IL-12. Außerdem aktiviert sie antimikrobielle Effektormechanismen in den Makrophagen (Stacey et al., 1996).

CpG-DNA vermag also sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem zu aktivieren, wobei dessen Wirkung auf das Immunsystem in zwei Stufen aufgeteilt werden kann: eine frühe Aktivierung des angeborenen Immunsystems und später eine Verstärkung der erworbenen Immunantwort. Dabei sind die Auswirkungen von CpG-DNA auf das Immunsystem nicht nur positiver Art. Bakterieller CpG-DNA wird eine Rolle bei der Entwicklung des septischen Schocks bei Infektion mit Gram-positiven Erregern zugeschrieben. So konnte die Induktion toxischer Serumkonzentrationen von Tumornekrosefaktor (TNF) *in vivo*, die mit Schocksymptomen einhergehen wie sie aus LPS-Modellen bekannt sind, durch bakterielle DNA hervorgerufen werden (Knuefermann et al., 2008; Sparwasser et al., 1997 a; Sparwasser et al., 1997 b).

2.5 Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligodesoxynukleotide (ODN), die unmethylierte CpG-Motive enthalten, imitieren die Anwesenheit von mikrobieller DNA und induzieren somit ein charakteristisches Aktivierungsmuster in Immunzellen (Krieg et al., 1995). Von den meisten Zellen des

Immunsystems werden ODN endozytotisch aufgenommen, doch nur wenige können auf diesen Stimulus reagieren, abhängig von der TLR9-Expression. Bei diesen ODN handelt es sich um kurzkettige, einzelsträngige DNA-Moleküle, bestehend aus mehreren Nukleotiden, die zentral ein CG-Dinukleotid enthalten. Die Basen sind über Phosphatbrücken über eine 3'-5'-Bindung miteinander verbunden. Bei den Phosphatbrücken handelt es sich bei natürlich vorkommender DNA um Phosphodiesterbrücken; diese können aber bei synthetisch hergestellten ODN durch Phosphorothioatbrücken ersetzt werden, bei denen ein nicht-bindendes Sauerstoffatom in der Phosphatgruppe der Zuckerkette durch ein Schwefelatom ersetzt ist. Dies soll die Stabilität gegenüber extra- und intrazellulär vorkommenden Endonukleasen steigern. Außerdem besitzt das Phosphorothioat-Rückgrat selbst immunstimulatorische Kapazität.

	CG-Dinukleotide	Methylierung am Cytidin
Wirbeltier-DNA	1 von 60 Dinukleotiden	ja
Bakterielle DNA	1 von 16 Dinukleotiden	nein
CpG-Oligonukleotid	vorhanden (CpG-Motive; z.B. 5`... GACGTT...3`)	nein

Tabelle 3: Vergleich zwischen DNA und CpG-ODN (Rothenfußer et al., 2001)

Bislang wurden drei CpG-Klassen zunächst vor allem aufgrund ihres unterschiedlichen immunstimulatorischen Wirkprofils, das mit Unterschieden in der primären Sequenz und in der Sekundär- und Tertiärstruktur der ODN einhergeht, definiert. Allen drei Klassen ist jedoch die Auslösung einer Immunantwort über eine TLR9-abhängige Signaltransduktion gemein (Vollmer et al., 2004).

- CpG-A (auch: CpG-D), Prototyp ODN 2216 (Krug et al., 2001)

CpG-A besitzt eine hohe Aktivität hinsichtlich der Aktivierung von NK-Zellen und der Induktion von IFN- α bedingt durch seinen chimärischen Aufbau: Das palindromische CpG-beinhaltende Zentrum ist Phosphodiester gebunden, wohingegen die sich am 5'- und 3'-Ende befindenden Poly-Guanin-Sequenzen (Poly-G-Sequenzen) größtenteils Phosphorothioat-gebundenen sind (Ballas et al., 1996). Die Poly-G-Motive verbessern die zelluläre Aufnahme (Dalpke et al., 2002) und zusätzlich die NK-Aktivierung.

- CpG-B (auch: CpG-K), Prototyp: ODN 2006 (Krieg 2002)

CpG-B liegt einzelsträngig und komplett an Phosphorothioat gebunden vor. Es fördert das Überleben und die Aktivierung und Ausreifung der pDC. Außerdem ist es ein starkes B-Zell-Stimulans, erzeugt jedoch nur eine schwache NK-Aktivierung und wenig IFN- α in pDC.

- CpG-C, Prototyp: ODN M362 (Hartmann et al., 2003)

CpG-C ist komplett Phosphorothioat-modifiziert und enthält ein CpG-reiches Palindrom im Zentrum. Diese CpG-Klasse vereint die Effekte von Klasse A und B. Neben einer hohen Induktion von IFN- α in pDC kommt es außerdem zu einer starken B-Zell-Aktivierung.

Die Signaltransduktion der ODN erfolgt in 2 Schritten. Zunächst werden sie über einen Rezeptor-vermittelten Prozess aufgenommen. Hier wurden einige Rezeptoren wie das Integrin Mac-1/CD11b, „membrane associated nucleic acid binding protein“ (MNAB) und Scavenger Rezeptor-A (SR-A) diskutiert, wobei keiner dieser Rezeptoren eindeutig für die ODN-Internalisierung bestätigt werden konnte (Benimetskaya et al., 1997; Siess et al., 2000; Zhu et al., 2001). Der Prozess ist unabhängig von spezifischen CpG-Motiven, kann allerdings durch Modifikationen des Phosphorothioatrückgrates oder Poly-G-Sequenzen am 3'-Ende beeinflusst werden (Dalpke et al., 2002). Nach der Endosomenreifung wird das CpG-Motiv spezifisch von TLR9 erkannt.

2.5.1 Inhibitorische synthetische Oligonukleotide

Erste Erkenntnisse, dass DNA auch inhibitorische Eigenschaften aufweisen kann, stammen von der Beobachtung, dass bestimmte ODN Poly-G-Sequenzen enthalten, die die durch bakterielle DNA induzierte Produktion von IFN- γ blockieren können (Halpern et al., 1995). Dieser Effekt wurde allerdings durch hohe mikromolare Konzentrationen an ODN erzielt, bedurfte der Stabilisierung mittels Phosphorothioatrückgrat und war nicht spezifisch für den TLR9-Transduktionsweg (Shirota et al., 2004; Zhu et al., 2002). Einige Jahre später zeigten Krieg und Mitarbeiter, dass die DNA bestimmter Adenoviren nicht nur nicht-stimulierend, sondern vollständig hemmend auf CpG-induzierte Immunantworten wirkt (Krieg et al., 1998). Als verantwortlich für diesen inhibitorischen Effekt zeigten sich CpG-Dinukleotide, die im Basenkontext eines vorangehenden Cytosins und eines nachfolgenden Guanins stehen.

Methylierte CpG-Motive zeigten ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf immunstimulatorisch wirkende CpG-DNA.

Später wurde auch in Telomeren vertebraler DNA inhibitorische Sequenzen gefunden (Gursel et al., 2003). Es handelt sich dabei um repetitive TTAGGG-Motive, die die chromosomalen Enden vor Degradation schützen. ODN, die diese Sequenz enthalten, können die durch TLR9-Liganden und andere Aktivatoren und Antigene induzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine inhibieren (Gursel et al., 2003; Klinman et al., 2009).

In den folgenden Jahren wurden die Wirkungen von auf TLR9 inhibitorisch wirkenden Oligonukleotiden (iODN) vornehmlich in Mausmodellen mehr und mehr untersucht. So wurde im Jahr 2003 gezeigt, dass iODN sowohl die Inflammation als auch die Gelenkschwellung in einem murinen Modell inflammatorischer Arthritis signifikant reduzieren (Zeuner et al., 2003). Dieser Effekt traf am stärksten bei iODN-Gabe bereits vor intraartikulärer Injektion bakterieller DNA auf. Applikationen zu späteren Zeitpunkten gingen mit einer geringeren inhibitorischen Wirkung einher.

Die Gruppe um Yamada demonstrierte im Jahr 2004, dass iODN die inflammatorische Antwort auf CpG-DNA in murinen Alveolarmakrophagen signifikant inhibieren (Yamada et al., 2004). Ihre Studie unterstützte die Annahme, dass iODN von Nutzen sein können, um die durch bakterielle DNA induzierte schädliche Wirkung der Immunantwort zu vermindern. Im selben Jahr wurde anhand eines murinen Modells von SLE gezeigt, dass iODN sowohl das Einsetzen einer Lupus Nephritis als auch die Progression einer bereits bestehenden Lupus Nephritis verzögern (Dong et al., 2004).

2008 konnten Plitas und Mitarbeiter zeigen, dass die Behandlung von Mäusen mit iODN diese vor Sepsis-induzierter Mortalität schützt. Eine einzige Injektion eines iODN schützte die Mäuse vor dem Tod durch Sepsis, auch wenn die Injektion erst 12 Stunden nach Bakterienbelastung mittels CLP (Zökale Ligatur und Punktion) erfolgte. Im *in vitro* Versuch reduzierten iODN die Produktion proinflammatorischer Zytokine von Splenozyten, die mit Mäusedarminhalt stimuliert worden waren. Es stellte sich heraus, dass TLR9-defiziente Mäuse resistent gegenüber septischer Peritonitis sind, jedoch hoch anfällig auf Gram-negative und Gram-positive Pneumonie und Infektion mit dem intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* reagieren. Eine mögliche Erklärung dieser offenbaren Diskrepanz könnte sein, dass eine begrenzte TLR9-Stimulation eine

protektive Immunität verleiht, wogegen eine sehr starke TLR9-Aktivierung zu einer überschießenden, schädlichen Immunantwort führt. Es ist anzunehmen, dass die Infektion durch ein einziges Pathogen TLR9 nur im begrenzten Umfang aktiviert, während es bei einer polymikrobiellen Peritonitis zu einer starken TLR9-Stimulation kommt. Somit stellt die TLR9-Blockade eine potentielle Strategie in der Behandlung einer polymikrobiellen Sepsis dar (Plitas et al., 2008). Generell wird davon ausgegangen, dass iODN nützlich bei Krankheitsbildern sein könnten, bei denen die Wirtsantwort auf bakterielle DNA zur Pathologie beiträgt, wie beim septischen Schock oder Autoimmunerkrankungen. Da iODN spezifisch die inflammatorische Antwort auf bakterielle DNA abschwächen, könnte die Therapie mit diesen Substanzen die schädlichen Nebeneffekte, die mit einer generellen Immunsuppression assoziiert sind, vermeiden.

Durch Modifikationen am DNA-Rückgrat, an einzelnen Basen oder am 5'- und 3'- Ende der DNA wurden Einblicke in die Struktur-Aktivitätsbeziehung von CpG-ODN gewonnen (Kandimalla et al., 2001; Narayanan et al., 2003; Yu et al., 2002). Anhand von systematischer Veränderung synthetischer ODN wurden optimale DNA-Motive für die Inhibition von TLR9 identifiziert. In Studien zur strukturellen Charakterisierung und Sequenzanalyse inhibitorischer CpG-Motive gelang es der Arbeitsgruppe um Lenert einen Katalog mit Regeln für eine möglichst effiziente TLR9-Inhibition aufzustellen:

Regeln der TLR9-Inhibition
1) Ein CpG-Motiv (ob methyliert oder unmethyliert) ist für eine Inhibition nicht notwendig.
2) Drei aufeinander folgende Guanosinbasen sind notwendig.
3) Das 5`-Ende eines ODN ist sowohl für die Stimulierung als auch für die Inhibition wichtig: Ein TCC Triplet bewirkt eine optimale Stimulierung, ein CC(T) Triplet eine optimale Inhibition.
4) Der Abstand zwischen dem CC(T) und dem nächsten GGG Triplet in 3`-Richtung ist optimal 3 bis 5 Nukleotide lang.
5) Die Reihenfolge 5`-CC(T)→GGG-3` ist wichtig, da ODN mit umgekehrter Reihenfolge keine inhibitorische Aktivität aufweisen.
6) Die Sequenz zwischen den CC(T) und GGG Motiven trägt nur minimal zu der ODN-Aktivität bei und toleriert multiple Modifikationen.
7) Am 3`-Ende trägt nicht die Sequenz, sondern die Länge wesentlich zur ODN-Aktivität bei.
8) Die spezifische Inhibition TLR9-induzierter Aktivierung bedarf keiner Hoogsten Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten Guanosinbasen.
9) Lineare iODN, die nicht dazu in der Lage sind, solche Verbindungen einzugehen, sind genau so effektive TLR9-Inhibitoren.

Tabelle 4: Regeln der TLR9-Inhibition (nach Lenert, 2010)

Es stellt sich die Frage nach dem Wirkmechanismus der iODN. Da bisher unterschiedlichste Sequenzen als inhibitorisch wirkend erkannt worden sind, liegt es nahe, dass verschiedene iODN die TLR9-Inhibition über unterschiedliche Mechanismen auf verschiedenen Ebenen erzielen. So könnten iODN bereits auf der Ebene der rezeptorvermittelten Endozytose oder Phagozytose wirken, im Sinne einer kompetitiven Antagonisierung. Dies würde unter anderem vom Zelltyp, der Anwesenheit von Scavenger-Rezeptoren, der Oligonukleotidlänge und nicht zuletzt der Fähigkeit, G-Tetraden zu bilden, abhängen (Gursel et al., 2006; Pearson et al., 1993; Trieu et al., 2006). Weitere Möglichkeiten sind die Inhibition der intrazellulären Umverteilung von TLR9 in Richtung des lysosomalem Kompartiments oder dessen Prozessierung in ein funktionsfähiges Protein. Auf der Ebene des Endosoms könnten iODN als kompetitive Antagonisten wirken und dadurch die für die Rekrutierung des Adapterproteins MyD88 notwendige Konformationsänderung von TLR9 verhindern. Ein weiterer Inhibitionsmechanismus könnte die

Hemmung der Endosomenreifung (ähnlich dem Wirkprinzip von Chloroquin) beinhalten. Letztlich ist auch eine Inhibition der dem TLR9 nach geschalteten Signalkaskade denkbar (Lenert et al., 2010).

2.6 Proinflammatorische Zytokine

Wie in 1.3.2 erwähnt, induzieren die durch TLR9-Stimulation aktivierten Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 die Transkription von Genen, die proinflammatorische Zytokine codieren. Wichtige Vertreter solcher Zytokine sind TNF, IL-1 β und IL-6.

Zytokine sind eine Familie von Proteinen und Polypeptiden, die nach Sekretion bei der Kommunikation und Regulation immunologischer Prozesse eine wichtige Rolle spielen. Darunter sind vor allem die Entstehung und Aufrechterhaltung einer Entzündung, die gegenregulatorischen Maßnahmen zur Wiederherstellung der Homöostase sowie die Regulation der Hämatopoese zu nennen. Dabei arbeiten Zytokine in picomolarer oder nanomolarer Konzentration (Curfs et al., 1997) und erzielen ihre modulierenden Effekte durch Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen (Mui et al., 1994). Bei der Induktion von Effektormechanismen gegen verschiedene Pathogene sind viele Zytokine beteiligt, die sowohl im Rahmen der angeborenen Immunität als auch im Verlauf der adaptiven Immunantwort von unterschiedlichen Zellen produziert werden. Bei vielen der beschriebenen Effekte wird dabei das Freisetzen anderer Zytokine und damit das Anstoßen einer Kaskadenreaktion beobachtet. Zytokine bilden ein Netzwerk, das die Kommunikation zwischen den einzelnen Bestandteilen des Immunsystems, aber auch mit anderen Systemen, wie z.B. Nervensystem und Endokriniem, ermöglicht.

Der Tumornekrosefaktor- α wird als eines der ersten Zytokine bei einer lokalen Entzündungsreaktion freigesetzt. Die Hauptproduzenten von TNF- α im Rahmen einer Entzündung sind vornehmlich Zellen hämatopoetischen Ursprungs wie beispielsweise aktivierte Makrophagen (Männel et al. 1980), Lymphozyten, NK-Zellen, Neutrophile Granulozyten und Mastzellen (Steffen et al., 1989). Die Aktivierung dieser Zellen erfolgt dabei meist durch bakterielle Produkte wie LPS, LTA oder CpG (Männel et al., 2000), wodurch TNF- α sezerniert wird und viele inflammatorische Effekte ausgelöst werden. So verstärkt dieses Zytokin z. B. die

Phagozytose von Granulozyten (Klebanoff et al., 1986) und bewirkt die Differenzierung von Monozyten (Gessani et al., 1993). Zudem vermittelt TNF- α die Freisetzung von IFN- γ durch T-Lymphozyten, die Induktion anderer Zytokine und von Akut-Phase Proteinen, die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, die Aktivierung des Endothels und die Apoptose von virusinfizierten Zellen (Ohno et al., 1993).

Ein weiterer Effekt von TNF- α ist die Verstärkung der Synthese von Interleukin-1 β (IL-1 β). Sowohl TNF- α als auch IL-1 β haben einen wesentlichen Einfluss in der Pathogenese der Sepsis (Cain et al., 1999). IL-1 β wird von fast allen kernhaltigen weißen Blutzellen ausgeschüttet (Fisher et al., 1994). Dies geschieht zum einen als Antwort auf exogene mikrobielle Stimuli (LPS, Exotoxine, Lektine), zum anderen als Reaktion auf endogene Moleküle, die bei Entzündungsprozessen freigesetzt werden (z.B. Komplementfaktor C5a, IFN- γ). Im Gegensatz zu IL-1 α , welches als Vorläuferprotein bereits voll aktiv ist, wird IL-1 β erst durch proteolytische Spaltung durch das „IL-1 beta converting enzyme“ (ICE) biologisch aktiv (Keane et al., 1995). IL-1 β aktiviert die Gewebemigration von neutrophilen Granulozyten und stimuliert im Verlauf der Entzündungskaskade die Bildung weiterer Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α). Außerdem induziert es die Proliferation von T- und B-Lymphozyten mit anschließender Immunglobulinbildung (Hoffmann, 1980). Bei Monozyten und Neutrophilen Granulozyten wird durch IL-1 β die Synthese von IL-6 und IL-8 aktiviert, was zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion führt. Neben der Rolle als vielseitiger Mediator des Immunsystems stimuliert IL-1 β die Biosynthese von Cyclooxygenase und Prostaglandin E₂, was zu generellen Symptomen wie Fieber führen kann.

Bei IL-6 handelt es sich wie bei TNF- α um ein ausgesprochen pleiotropes Zytokin, das an einer Vielzahl immunologischer Abläufe beteiligt ist. Es wird gemeinsam mit IL-1 α/β und TNF der Gruppe derjenigen proinflammatorischen Zytokine zugeschrieben, die an der Regulation der frühen Phase des Entzündungsgeschehens beteiligt sind (Hirano, 1992), und wird deshalb als das Interleukin der „akuten Phase“ bezeichnet. Interleukin-6 wird durch den TNF- α -Stimulus von aktivierten Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen ausgeschüttet (Heinrich et al., 1990). Es wirkt auf alle peripheren Zielzellen (B-Zellen, Hepatozyten, Fibroblasten) proinflammatorisch und wird für die klinischen Symptome des SIRS verantwortlich gemacht (Bone et al., 1996; Damas et al., 1991).

2.7 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Möglichkeit einer pharmakologischen Modulation der TLR9-abhängigen Inflammation mit synthetischen Oligonukleotiden oder Chloroquin *in vitro* evaluiert werden. Zwecks Simulation einer polymikrobiellen Sepsis wurden in einer Zellkultur RAW264.7 Makrophagen mit hitzeinaktivierten Darmbakterien stimuliert und 24 h später die Proteinexpression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 bestimmt. Nach Zugabe der TLR9-Modulatoren zu den Zeitpunkten 0, 3, 6 oder 9 h nach Infektion wurden die Proteinspiegel ebenfalls 24 h nach Infektionsbeginn gemessen.

3 Material und Methoden

3.1 Bezugsquellennachweis

3.1.1 Zelllinie

Für die Untersuchungen wurden murine Makrophagen RAW264.7, die aus Aszites von BALB/c-Mäusen generiert wurden, verwendet. Diese wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) erworben.

3.1.2 Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Sterilbank	Heraeus Instruments Typ HS 12/2, Hanau
Lichtmikroskop	Zeiss, Wetzlar
Wasserbad	GFL, Dülmen
Zentrifuge Typ 4121	Heraeus-Christ GMBH, Osterode
Vortex -Genie 2	Scientific Industries, Karlsruhe
Autoklav Varioklav Dampfsterilisator Typ 25T	Thermo Scientific, Karlsruhe
Eppendorf Research Pipetten der Größe 10, 20, 100, 200 und 1000 µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Neubauer Zählkammer, Tiefe 0,1 mm	Brand, Neuhof
Neubauer improved, Tiefe 0,01 mm	Marienfeld, Neu Isenburg
Microplate-Reader	Asys, Gödensdorf
Zellsiebe: 70 µm und 40 µm	BECTON dickinson, Heidelberg

Tabelle 5: Geräte

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Zellkulturflaschen: 250 ml, Wachstumsfläche 75 cm ²	greiner bio-one, Frickenhausen
Zentrifugationsröhrchen: 50 ml und 15 ml	greiner bio-one, Frickenhausen
Eppendorf Reaktionsgefäße: 1,5 ml, 0,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Einmal-Sterilglaspipette: 25, 10 und 5 ml	costar, Hamburg
Zellschaber: 23 cm	nunc, Rheinbach
24-Well-Platten	greine bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen: 10 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl und 1000 µl	AXYGEN, Darmstadt

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

3.1.4 Medien und Reagenzien

Medien und Reagenzien	Bezugsquelle
DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium 1X) 41965 mit Glucose (4,5g/L) und L-Glutamin	Gibco® invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Lösung (Pen Strep 15140)	Gibco® invitrogen, Karlsruhe
FBS Superior (Cat. No.: S 0615)	Biochrom AG, Berlin
Resochin® (Wirkstoff: Chloroquinphosphat)	Bayer, Leverkusen
Forene® (Wirkstoff: Isofluran)	Heraeus-Christ GMBH, Osterode
DEPC-Wasser (0,1%ige Lösung)	Sigma-Aldrich, München
Wasser ad injectabile	Braun, Melsungen
PBS (Phosphate Buffered Salt Solution)	Merck, Darmstadt
flüssiger Stickstoff	Linde, Köln

Tabelle 7: Medien und Reagenzien

3.1.5 Thioate

In den Stimulationsversuchen wurden Oligonukleotide, deren Phosphodiester-Gerüst Thioat-stabilisiert wurde, verwendet. Die in Tabelle 8 aufgelisteten Oligonukleotid-Sequenzen wurden deshalb als „Thioat“ bezeichnet. Durch diese Konstruktion wurde der Abbau durch Exo- und Endonukleasen inhibiert und die Halbwertszeit der Substanzen bzw. deren Wirkung verlängert. Die verwendeten ODN sind reich an Poly-G- und GC-Sequenzen, die häufig in vertebraler DNA, aber selten in bakterieller DNA vorkommen.

Thioat	Sequenz	Bezugsquelle
H154-Thioat	5`-CCT-CAA-GCT-TGA-GGG-G-3`	TiB MolBiol, Berlin
IRS954-Thioat	5`-TGC-TCC-TGG-AGG-GTT-GT-3`	TiB MolBiol, Berlin
1612-Thioat	5`-GCT-AGA-TGT-TAG-CGT-3`	TiB MolBiol, Berlin

Tabelle 8: Thioate

3.1.6 Chloroquin

Das als Therapeutikum gegen Malaria verwendete Chloroquin (Most et al., 1946) gilt als Inhibitor des TLR9 *signalling*. So zeigten Hong et al. in *in vivo* Untersuchungen, dass bei CpG-Stimulation die Gabe von Chloroquin zu einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führt (Hong et al., 2004). In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Chloroquin auf die Zytokinfreisetzung *in vitro* untersucht.

3.1.7 Kits

Für die Konzentrationsbestimmung verschiedener proinflammatorischer Zytokine wurden folgende Kits verwendet.

Kits	Bezugsquelle
Quantikine® Mouse TNF- α /TNFSF1A	R&D-Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Quantikine® Mouse IL-1 β /IL-1F2	R&D-Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Quantikine® Mouse IL-6	R&D-Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

Tabelle 9: Verwendete Kits

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

Alle Arbeiten mit den RAW264.7 Makrophagen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturbank mit laminarer Strömung der Firma Heraeus Instruments (Hanau) durchgeführt. Hierbei war zu beachten, dass das Luftgebläse mindestens 20 Minuten vor Arbeitsbeginn angeschaltet wurde. Medien bzw. Flüssigkeiten wurden vor Verwendung im Wasserbad (GFL, Dülmen) auf 37°C temperiert.

Die Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium) mit hohem Glukosegehalt (4,5g/L) und 4 mM L-Glutamin (Gibco®, Invitrogen) inkubiert. Zur Inhibition des Bakterienwachstums wurde das Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (je 10,000 Units/ml, Gibco®, Invitrogen) angesetzt. Des Weiteren wurden 10 % Fetales Kälberserum (FKS, Biochroma AG, Berlin), das als Quelle für Nährstoffe und Wachstumsfaktoren diente, hinzu pipettiert.

Bei der Stimulation mit murinen Darmbakterien (aus C57BL/6-Mäusen isoliert) wurde ein DMEM-Medium ohne FKS verwendet, um das Wachstum der Makrophagen während des Versuches konstant zu halten.

Für die Zellkultivierung wurden die Zellkulturen in einem Volumen von bis zu 40 ml angereichertem DMEM in Zellkulturflaschen der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen) gehalten und bei 37°C im Brutschrank (Binder, Tuttlingen) mit einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert. Damit Gasaustausch stattfinden konnte, wurde der Flaschendeckel leicht geöffnet. Je nach Teilungsgeschwindigkeit wurden die Kulturen alle 2 bis 3 Tage aufgeteilt und in neues Kulturmedium gegeben, um eine Apoptose (Zelltod), die durch Platzmangel auftreten kann, zu

vermeiden. Unter sterilen Bedingungen wurden dazu mit einem Schaber (Nunc, Rheinbach) die semiadhärenten Zellen vom Zellkulturflaschenboden gelöst und diese samt Medium in einem 50 ml fassendem Probengefäß (Greiner Bio-One) zehn Minuten bei 1.500 Umdrehungen pro Minute (600x g) zentrifugiert (Zentrifuge Typ 4121, Heraeus-Christ GMBH, Osterode). Der so entstandene Überstand wurde entfernt und das sich auf dem Boden des Probengefäßes befindliche Zellpellet in 25 ml frischem Nährmedium resuspendiert. Schließlich wurden jeweils 5 ml in neue Zellkulturflaschen überführt und mit frischem Zellkulturmedium auf bis zu 40 ml aufgefüllt.

3.2.2 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzählung wurde die Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1mm) der Firma Brand (Brand, Neuhof) verwendet. Unter sterilen Bedingungen wurden 10 µl aus der Zellsuspension entnommen und in 90 µl sterilem PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) resuspendiert, um eine 1:10-Verdünnung zu erhalten. Nach Durchmischung wurden zweimal 10 µl entnommen und nach Auflegen eines Deckglases auf die Zählkammer seitlich aufpipettiert, so dass die Zellsuspension durch Kapillarkräfte in die Kammer gesogen wurde. Eine Zählkammer besteht aus zwei Zählfeldern. Eines dieser Zählfelder ist in Abbildung 3 dargestellt. Lichtmikroskopisch wurden die vier äußeren Großquadrate, die aus jeweils 16 Kleinquadraten bestehen, ausgezählt. Dies geschah in beiden Zählfeldern, so dass insgesamt acht Großquadrate ausgezählt wurden. Der daraus errechnete Mittelwert wurde in folgende Formel eingesetzt, um die Zellzahl zu berechnen:

$$\text{Mittelwert} \times 10^5 = \text{Zellzahl} / \text{ml}$$

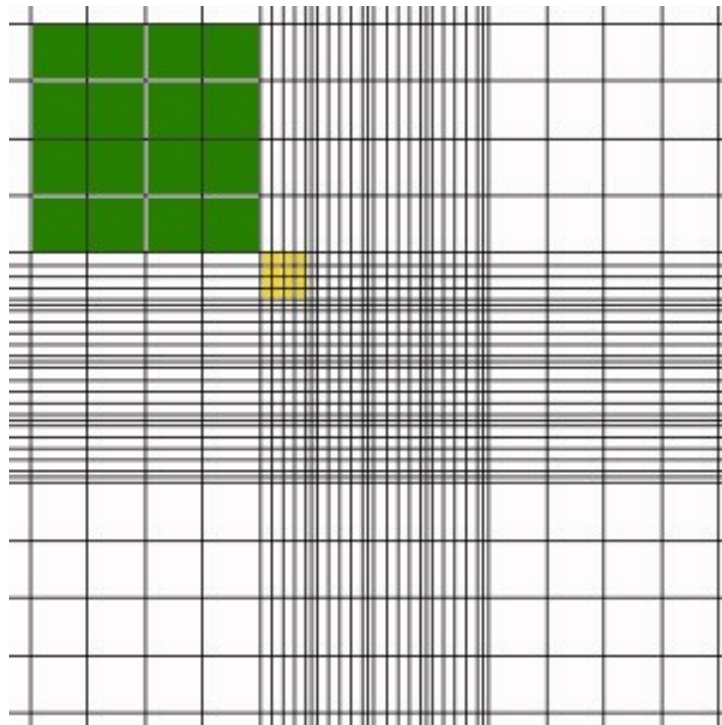


Abbildung 3: Am Beispiel der Neubauer Improved Zählkammer soll das Prinzip der Kammeraufteilung erläutert werden. Bei dem in grün unterlegten Bereich handelt es sich um eins der vier randständigen Großquadrate, in gelb ist ein Kleinquadrat innerhalb des zentralen Großquadrates dargestellt.

3.2.3 Isolation von murinen Darmbakterien

Für die Isolation von Darmbakterien wurden C57BL/6-Mäuse mittels Isofluran (Forene®, Heraeus-Christ GMBH) narkotisiert und durch Atlanto-okkzipitale Dislokation getötet. Ihr Darm wurde entnommen und in einzelne Segmente unterteilt. Der Darminhalt wurde in sterilem PBS aufgenommen und anschließend erst in einem 70 µm-, dann in einem 40 µm-Nylonsieb der Firma Becton Dickinson (BD, Heidelberg) filtriert. Daraufhin erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Bakterien in einem Wasserbad für 60 Minuten bei 80°C. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.2.4 Bakterienzahlbestimmung

Hierfür wurde die Neubauer Improved Zählkammer mit einer Kammertiefe von 0,01 mm verwendet (Marienfeld, Neu Isenburg). Nach Homogenisierung der Bakteriensuspension wurden 10 µl unter sterilen Bedingungen entnommen und mit 90 µl PBS vermischt (1:10-Verdünnung). Aus dieser homogenisierten Suspension wurden wiederum 10 µl entnommen und mit 90 µl PBS vermischt (1:100-Verdünnung). Ausgezählt wurden fünf Kleinquadrate innerhalb des zentralen Großquadrates und dieses in beiden Zählfeldern, so dass insgesamt zehn Kleinquadrate ausgezählt wurden. Der Mittelwert wurde in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Mittelwert} \times 100 \times 2,5 \times 10^6 = \text{Bakterienzahl / ml}$$

3.2.5 Stimulation der Zellen

Vor der Stimulation wurden die Makrophagen, wie beim Umsetzen in neue Kulturflaschen, mit einem Zellschaber (Nunc, Rheinbach) aus den Kulturschalen gelöst und bei 1.500 Umdrehungen pro min (600x g) bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen; die Zellpellets wurden in 30 ml FKS-freiem DMEM-Medium vereint. Anschließend wurde in der Zellsuspension die Zellzahl bestimmt. Das entsprechende Volumen um die gewünschte Zellzahl zu erzielen (z.B. 26,64 Millionen Zellen pro 24 Wells) wurde entnommen und wiederum bei 1.500 Umdrehungen pro min (600x g) bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen.

Parallel zur Behandlung der Makrophagen wurde die Bakterienzahl auf ähnliche Art und Weise bestimmt. Um eine Homogenität der Stimulation zu erzielen, wurde das Volumen, in dem sich die angestrebte Bakterienzahl (z.B. 26,64 Millionen Zellen pro 24 Wells) befand, in FKS-freiem DMEM-Medium gelöst. Dieses mit Bakterien vorbehandelte Medium wurde für die Resuspension der Makrophagen nach dem zweiten Zentrifugationsschritt verwendet.

Anfänglich wurden Suspensionen mit 10, 5, 2 und 1 Million Makrophagen pro 1 Million Darmbakterien hergestellt. Nachdem sich zeigte, dass 1 Million Makrophagen pro 1 Million

Verhältnis Makrophagen/Darmbakterien gearbeitet. Es wurde der Quotient aus benötigter Zellzahl pro Well und vorliegender Zellzahl/ml gebildet und damit berechnet, welche Menge der Zellsuspension für das Experiment benötigt wurde. Aus dem Zielvolumen von 900 µl ergab sich der Multiplikationsfaktor 1,1. Folgende Formel wurde verwendet:

$$\frac{\text{Anzahl der Wells} \times 1,1 \times 10^6}{\text{Zellzahl}} = \text{Menge der Zellsuspension [ml]}$$

Die entsprechende Menge an Zellsuspension wurde zehn Minuten bei 1.500 Umdrehungen pro Minute (600x g) zentrifugiert und das entstandene Zellpellet mit der benötigten Menge an Nährmedium (ohne FKS) resuspendiert.

Um die Menge der benötigten Bakteriensuspension zu berechnen wurde die gleiche Formel verwendet:

$$\frac{\text{Anzahl der Wells} \times 1,1 \times 10^6}{\text{Bakterienzahl}} = \text{Menge der Bakteriensuspension [ml]}$$

Die entsprechende Menge an Bakteriensuspension wurde mit der Zellsuspension vermischt. Nun wurden je 900 µl dieses Zell-Bakterien-Gemischs in die Wells von 24-Well-Platten (Firma Greiner Bio-One, Frickenhausen) pipettiert. Somit befanden sich in jedem Well je 1 Million Makrophagen und 1 Million Darmbakterien. Die Stimulationszeit mit Darmbakterien betrug 24 Stunden.

3.2.6 Gabe der Reagenzien zur Inhibition der Zytokinexpression

Die Zugabe der zu testenden Reagenzien erfolgte je nach Versuch 0, 3, 6 oder 9 Stunden nach Zugabe der Darmbakterien zu den Makrophagen. Ziel dieser poststimulatorischen Substanzapplikation war die Simulation der Medikation eines bereits septischen Patienten. Es wurden pro Well 100 µl der entsprechenden Substanz hinzu gegeben. Bei jedem Versuch wurden außerdem zwei Kontrollansätze hergestellt:

- unstimulierte Makrophagen in 1 ml Gesamtvolumen, um die basale Zytokinproduktion zu ermitteln (Kontrolle)

- stimulierte Makrophagen in 1 ml Gesamtvolumen (Positivkontrolle).

Bis zur Beendigung des Versuchs nach 24 Stunden wurden die Zellansätze im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ aufbewahrt.

3.2.7 Zellernte

Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurde der Versuch beendet. Die Suspension aus Zellen, Bakterien und Reagenz wurde mit Hilfe einer 1 ml Kolbenhubpipette (Eppendorf, Hamburg) aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) überführt. Die Probe wurde auf Eis gelagert. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 10.000 Umdrehungen pro Minute (10.000x g) und einer Temperatur von 4°C (Eppendorf) wurde der entstandene Überstand abgenommen und auf zwei 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt (Aliquots á 450 µl). Die Überstände und im Probengefäß befindliche Zellpellets wurden bei -80°C gelagert.

3.2.8 Bestimmung von TNF- α mittels „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Testprinzip

In diesem Teilversuch sollte die TNF- α -Konzentration im Zellkulturüberstand nach Stimulation mit den jeweiligen Substanzen gemessen werden. Bei dem hier angewandten Verfahren handelt es sich um ein immunologisches Nachweisverfahren, dem eine enzymatische Farbreaktion zu Grunde liegt. Das Testprinzip beruht auf dem sog. „Sandwich“-Verfahren, da das zu bestimmende Antigen (hier TNF- α) zwischen zwei Antikörpern eingebettet wird. Der erste Antikörper gegen TNF- α ist an die Wellböden einer Mikrotiterplatte gebunden. Die Proben mit zu bestimmender Antigenkonzentration werden in die Wells pipettiert und inkubiert, so dass sich das Antigen in Abhängigkeit von seiner Konzentration an den plattengebundenen Antikörper binden kann. Durch anschließendes Waschen werden die ungebundenen Bestandteile der Probe entfernt. Daraufhin wird ein Überschuss an enzymmarkiertem Antikörper hinzugeben. Während

einer erneuten Inkubationsphase bindet dieser zweite Antikörper ebenfalls an das Antigen, wodurch ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex („Sandwich-Komplex“) entsteht. Die nicht gebundenen Antikörper werden in einem erneuten Waschschrift entfernt. Nun wird eine farblose Substratlösung hinzugegeben, die sich bei Kontakt mit dem am zweiten Antikörper befindenden Enzyms (Horseraddishperoxidase, HRP) in ein farbiges Produkt umwandelt. Die Farbintensität entspricht dabei der Menge des zu bestimmenden Antigens. Schließlich wird die enzymatische Reaktion nach einem definierten Zeitraum durch eine Säurelösung gestoppt und die Menge des farbigen Produkts photometrisch bestimmt.

Substanzen

Alle vorgefertigten Reagenzien wurden dem Kit „Quantikine® Mouse TNF- α /TNFSF1A“ der Firma R&D-Systems (Wiesbaden-Nordenstadt) entnommen:

- Mouse TNF- α Microplate
- Mouse TNF- α Conjugate
- Mouse TNF- α Standard
- Mouse TNF- α Control
- Assay Diluent RD1W
- Calibrator Diluent RD5Z
- Wash Buffer Concentrate
- Color Reagent A und B
- Stop Solution
- Plate Covers

„TNF- α Standard“ wurde in 2 ml „Calibrator Diluent RD5Z“, „Mouse TNF- α Control“ in 1 ml deionisiertem Wasser aufgelöst. Außerdem wurden 25 ml des „Wash Buffer Concentrate“ mit 600 ml destilliertem Wasser vermischt.

Praktische Durchführung

1. Die Proben wurden auf Zimmertemperatur gebracht.

2. Nach Herstellung der benötigten Reagenzien (siehe oben) erfolgte ein 1:10-Verdünnung der Proben mit gebrauchsfertiger Control Diluent (20 µl Probe + 180 µl Control Diluent). Der benötigte Verdünnungsfaktor wurde in Vorversuchen herausgefunden.
 3. Es wurden 50 µl Assay Diluent in jedes Well der Mikrotiterplatte gegeben.
 4. Daraufhin wurden 50 µl Standard bzw. 50 µl vorverdünnte Probe in jeweils zwei Wells (Doppelbestimmung) einpipettiert. Nach Verschließen der Platte mit einer Plastikfolie erfolgte eine zweistündige Inkubation bei RT.
 5. Nach 5 Waschgängen (400 µl pro Well, Asys Microplate Washer, Asys Hitech, Eugendorf, Österreich) mit dem vorbereiteten Waschpuffer wurden pro Well 100 µl Detektor-Antikörper (Conjugate) hinzupipettiert. Die Platte wurde mit einer Plastikfolie versiegelt. Erneut erfolgte eine zweistündige Inkubation bei RT.
 6. Nach fünfmaligem Waschen wurden 100 µl Substratlösung (Reagenz A : Reagenz B = 1:1) in jedes Well pipettiert und es erfolgte eine lichtgeschützte Inkubation für 30 Minuten.
 7. Pro Well wurden 100 µl Stop Solution einpipettiert.
 8. Es folgte die Absorptionsmessung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Kontrollwellenlänge von 540 nm mittels Photometer. Mit Hilfe einer Software (Microplate Reader, Asys Hightech, Eugendorf) wurde eine Eichkurve erstellt, indem die Standardkonzentrationen (in pg/ml) linear auf der X-Achse und die Optische Dichte (OD) linear auf der Y-Achse aufgetragen wurden. Mit Hilfe dieser Eichkurve erfolgte schließlich das Ablesen der TNF- α -Konzentrationen durch die jeweiligen Absorptionswerte. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Mikrowin 2000[®] der Firma Asys Hightech.
- Alle Schritte wurden streng nach dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll durchgeführt. Die Sensitivität des ELISA wurde vom Hersteller geprüft. Die minimale detektierbare Dosis beträgt 5,1 pg/ml. Signifikante Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen konnte vom Hersteller ausgeschlossen werden.

3.2.9 Bestimmung von IL-1 β und IL-6 mittels ELISA

Hier wurde analog zur Bestimmung von TNF- α verfahren und die Kits „Quantikine[®] Mouse IL-1 β /IL-1F2“ sowie „Quantikine[®] Mouse IL-6“ der Firma R&D-Systems verwendet. Um IL-1 β zu bestimmen wurden die Proben 1:2 verdünnt (150 μ l Probe + 150 μ l Control Diluent), während die Proben zur IL-6-Bestimmung 1:5 verdünnt wurden (40 μ l Probe + 160 μ l Control Diluent). Die minimal detektierbare Dosis für IL-6 beträgt 1,6 pg/ml, diejenige für IL-1 β wird von der Firma mit 3,0 pg/ml benannt.

3.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der mittels ELISA gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism[®] 4.0 (GraphPad Software[®], San Diego, USA). Dazu wurde eine multifaktorielle Varianzanalyse (Two-Way-Anova) und eine anschließende Bonferroni *post-hoc* Analyse durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt. In der graphischen Darstellung entspricht die Höhe der Säule dem Mittelwert und die zusätzliche Markierung der Streuung in Form des Standardfehlers des Mittelwertes der Messung.

4 Ergebnisse

4.1 Simulation einer polymikrobiellen Sepsis *in vitro*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand nach Stimulation mit hitzeinaktivierten murinen Darmbakterien und Zugabe der zu testenden Substanzen mittels ELISA bestimmt. Getestet wurden die CpG-ODN H154-, IRS954- und 1612-Thioat sowie das Pharmakon Chloroquin. Die Versuchsdauer betrug für alle Untersuchungen 24 Stunden. Es wurde die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 untersucht, da diese eine wichtige Rolle für die Entstehung und Progression einer Sepsis spielen. Die Gruppengröße betrug n=6. In allen Versuchen wurde mit Kontrollen gearbeitet. Nicht durch Darmbakterien infizierte Zellsuspensionen aus Makrophagen dienten jeweils als Kontrollen.

In Vorversuchen wurde die geeignete Konzentration an hitzeinaktivierten Darmbakterien ermittelt, um eine ausreichende TNF- α Produktion der Makrophagen zwecks Simulation einer polymikrobiellen Sepsis hervorzurufen. Es wurden Zellsuspensionen mit jeweils 10, 5, 2 und 1 Million Darmbakterien hergestellt und die TNF- α Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA gemessen, um die Wirkung unterschiedlicher Bakterienmengen zu untersuchen (Daten nicht dargestellt). Es zeigte sich, dass 1 Million Bakterien ausreichen, um einen statistisch signifikanten Effekt zu erzielen. Somit wurde in allen folgenden Versuchen mit dieser Anzahl an Makrophagen gearbeitet.

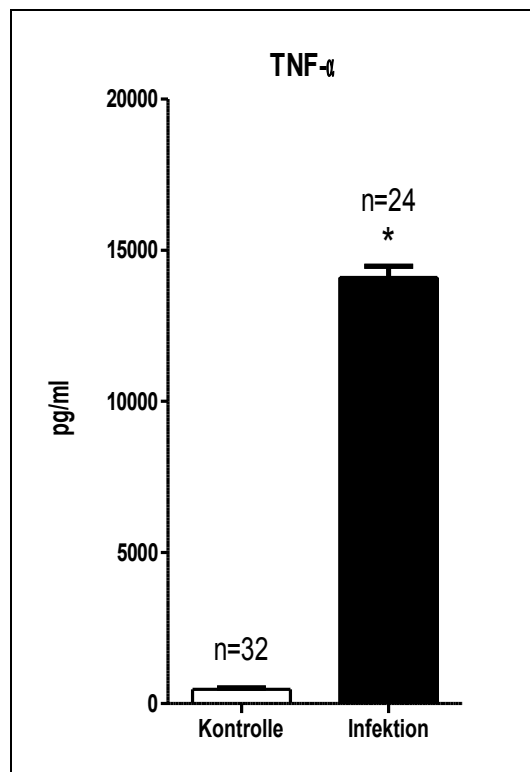


Abbildung 4: TNF- α Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die TNF- α Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Mittelwert der Kontrolle: 510,61; Standardfehler des Mittelwertes der Kontrolle: 321,61; Mittelwert der Infektion: 14096,03; Standardfehler des Mittelwertes der Infektion: 1539,91.

4.2 Kontrolle der zu testenden Substanzen

Es wurde untersucht, ob die vier im Rahmen dieser Arbeit getesteten Substanzen unstimulierte Makrophagen in ihrer TNF- α Produktion beeinflussen. Es zeigte sich, dass die Zugabe der TLR9-Modulatoren zu nicht-infizierten Makrophagen die TNF- α Protein Konzentration im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert.

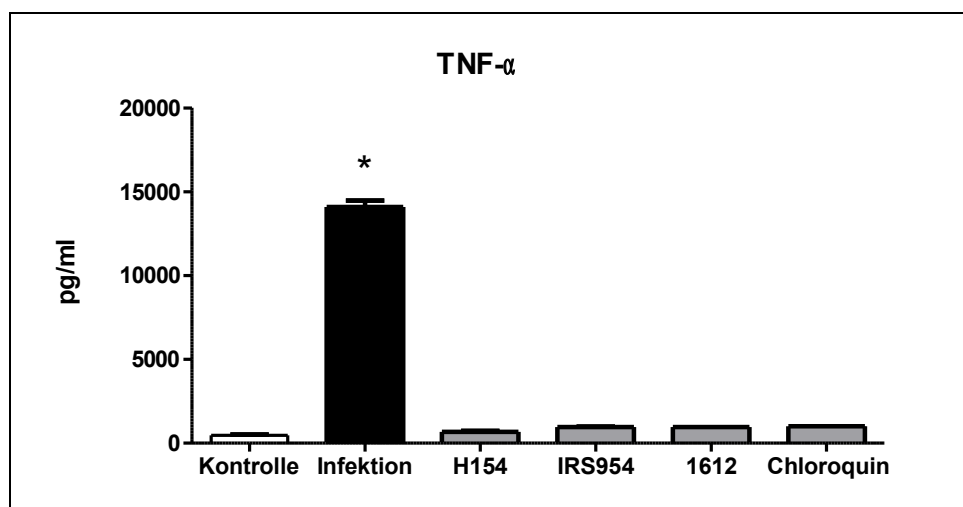


Abbildung 5: TNF- α Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die TNF- α Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Zugabe der synthetischen Oligonukleotide in einer Konzentration von 5 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch und Chloroquin in einer Konzentration von 10 μ g pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch zu nicht-infizierten Makrophagen beeinflusst die TNF- α Protein Konzentration im Vergleich zur Kontrolle nicht (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

4.3 Konzentrationsfindung

4.3.1 H154-Thioat

Um diejenige Menge an H154-Thioat herauszufinden, die geeignet ist, die TNF- α Produktion signifikant zu hemmen, wurde ein Stimulationsversuch mit den H154-Thioat Konzentrationen 10, 5 und 0,1 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch durchgeführt. Die Applikation von H154-Thioat erfolgte dabei zeitgleich mit der Infektion. Es zeigte sich, dass alle drei getesteten Konzentrationen die TNF- α Konzentration signifikant reduzieren. In den folgenden Versuchen wurde mit einer H154-Thioat Konzentration von 5 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch gearbeitet.

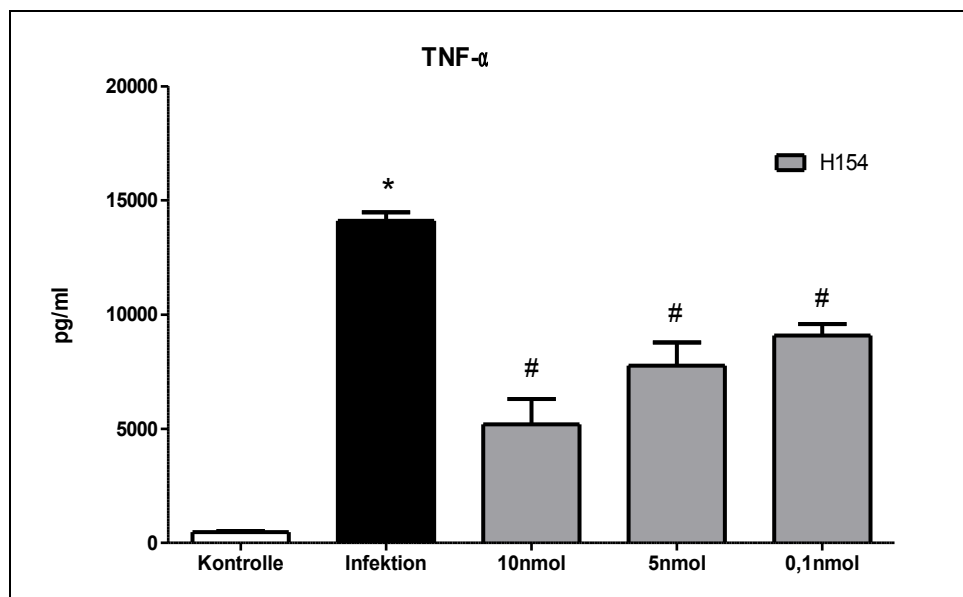


Abbildung 6: TNF- α Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die TNF- α Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die zeitgleich mit der Infektion erfolgte Zugabe von H154-Thioat in den Konzentrationen 10, 5 und 0,1 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch senkt in allen drei Konzentrationen die TNF- α Konzentration signifikant (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

4.3.2 IRS954-Thioat

Zur Findung einer geeigneten Konzentration an IRS954-Thioat wurde ein Stimulationsversuch mit den Konzentrationen 10, 5 und 1 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch durchgeführt. Dabei erfolgte die IRS954-Thioat Applikation zeitgleich mit der Infektion. Es zeigte sich, dass alle drei getesteten Konzentrationen die TNF- α Konzentration signifikant reduzieren. Für die folgenden Versuche wurde IRS954-Thioat in einer Konzentration von 5 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch verwendet.

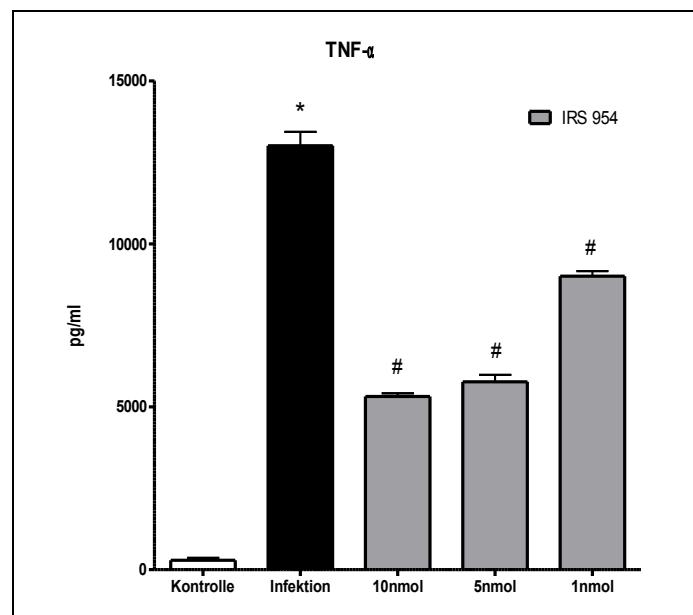


Abbildung 7: TNF- α Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die TNF- α Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die zeitgleich mit der Infektion erfolgte Zugabe von 10, 5 und 1 nmol IRS954-Thioat zu 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch senkt in allen drei Konzentrationen die TNF- α Konzentration signifikant (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

4.3.3 1612-Thioat

Ebenso wie mit dem Oligodinukleotid IRS954-Thioat wurde mit 1612-Thioat verfahren. Zur Konzentrationsfindung wurde ein Stimulationsversuch mit den Konzentrationen 10, 5 und 1 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch durchgeführt, wobei die Applikation von 1612-Thioat zeitgleich mit der Infektion erfolgte. Es zeigte sich, dass 1612-Thioat in den Konzentrationen 10 und 5 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch die TNF- α Menge signifikant reduziert, wohingegen eine Konzentration von 1 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch nicht ausreichend ist, um die TNF- α Proteinkonzentration signifikant zu senken. In den folgenden Versuchen wurde mit einer Konzentration von 5 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch gearbeitet.

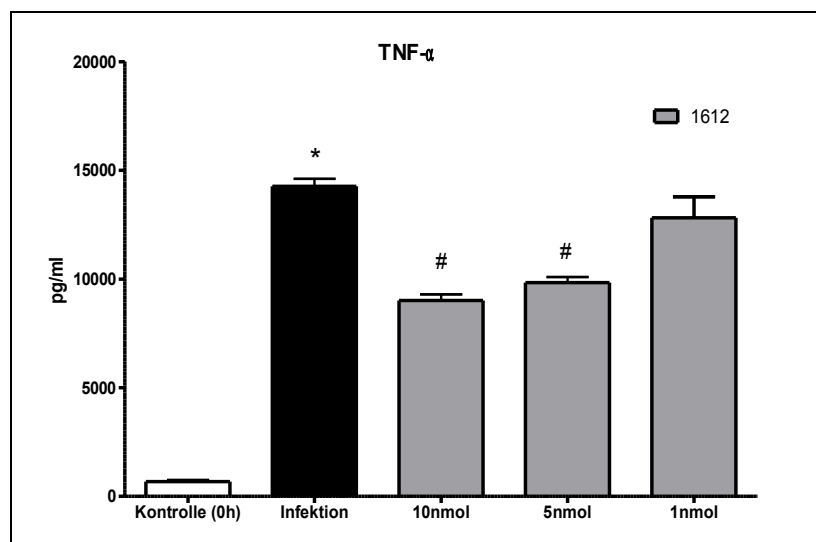


Abbildung 8: TNF- α Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die TNF- α Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die zeitgleich mit der Infektion erfolgte Zugabe von 10 und 5 nmol 1612-Thioat zu 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch senkt die TNF- α Konzentration signifikant. Die Zugabe von 1 nmol 1612-Thioat zu 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch bewirkt keine signifikante Senkung der TNF- α Konzentration (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

4.3.4 Chloroquin

Um die für die geplanten Versuche geeignete Konzentration von Chloroquin herauszufinden, wurde ein Stimulationsversuch mit den Konzentrationen 100, 50, 10 und 2,5 µg pro 900 µl Zell-Bakterien-Gemisch durchgeführt. Die Applikation von Chloroquin in den unterschiedlichen Konzentrationen erfolgte dabei zum Infektionszeitpunkt. Es zeigte sich, dass die Zugabe von Chloroquin in den Konzentrationen 100, 50 und 10 µg pro 900 µl Zell-Bakterien-Gemisch die TNF-α Konzentration signifikant senkt, wohingegen eine Chloroquinkonzentration von 2,5 µg pro 900 µl Zell-Bakterien-Gemisch nicht ausreichend ist, um die TNF-α Proteinkonzentration signifikant zu reduzieren. In den folgenden Versuchen wurde mit einer Konzentration von 10 µg pro 900 µl Zell-Bakterien-Gemisch gearbeitet.

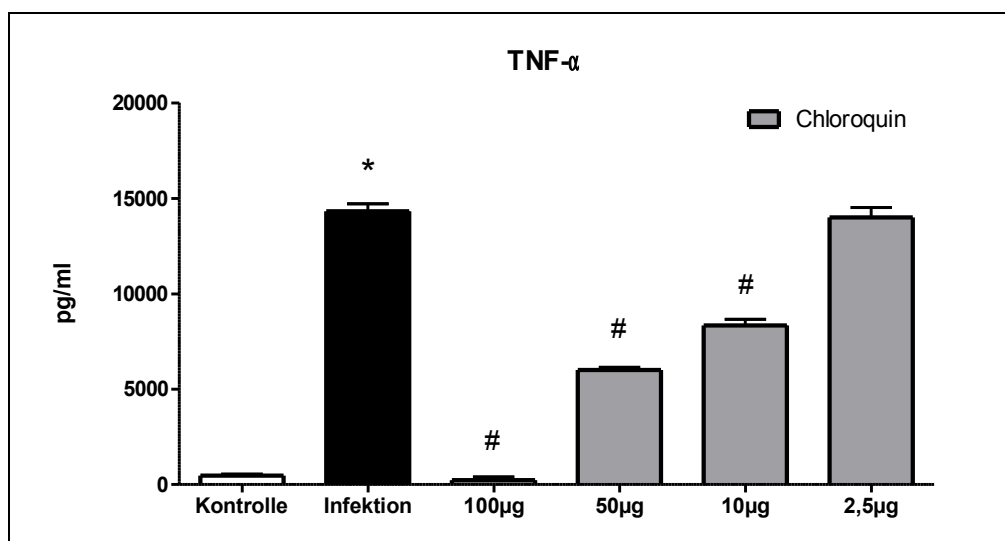


Abbildung 9: TNF-α Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die TNF-α Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die zeitgleich mit der Infektion erfolgte Zugabe von 100, 50 und 10 µg Chloroquin zu 900 µl Zell-Bakterien-Gemisch senkt die TNF-α Konzentration signifikant. Die Zugabe von 2,5 µg Chloroquin zu 900 µl Zell-Bakterien-Gemisch bewirkt keine signifikante Senkung der TNF-α Konzentration (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

4.4 H154-Thioat

4.4.1 Wirkung auf die TNF- α Produktion im Zeitverlauf

Die Zugabe der zu testenden Substanzen erfolgte zu mehreren Zeitpunkten, zum einen zeitgleich mit der Infektion, zum anderen zu verschiedenen Zeitpunkten *post infectionem*, nämlich nach 3, 6 und 9 h. Durch diese verzögerte Gabe sollte dem Umstand Rechnung getragen werden, dass die Medikation in der Praxis meist erst erfolgt, wenn der Patient bereits infiziert und eventuell septisch ist. Die Messung der Zytokinkonzentrationen erfolgte stets 24 h nach dem Infektionszeitpunkt.

Für die Substanz H154-Thioat zeigte sich, dass sie in einer Konzentration von 5 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch eine signifikante Reduzierung der TNF- α -Freisetzung bei Zugabe bis zu 6 h nach Infektion mit Darmbakterien bewirkt. 9 h *post infectionem* ließ sich keine signifikante Reduzierung der TNF- α Protein Konzentration mehr nachweisen.

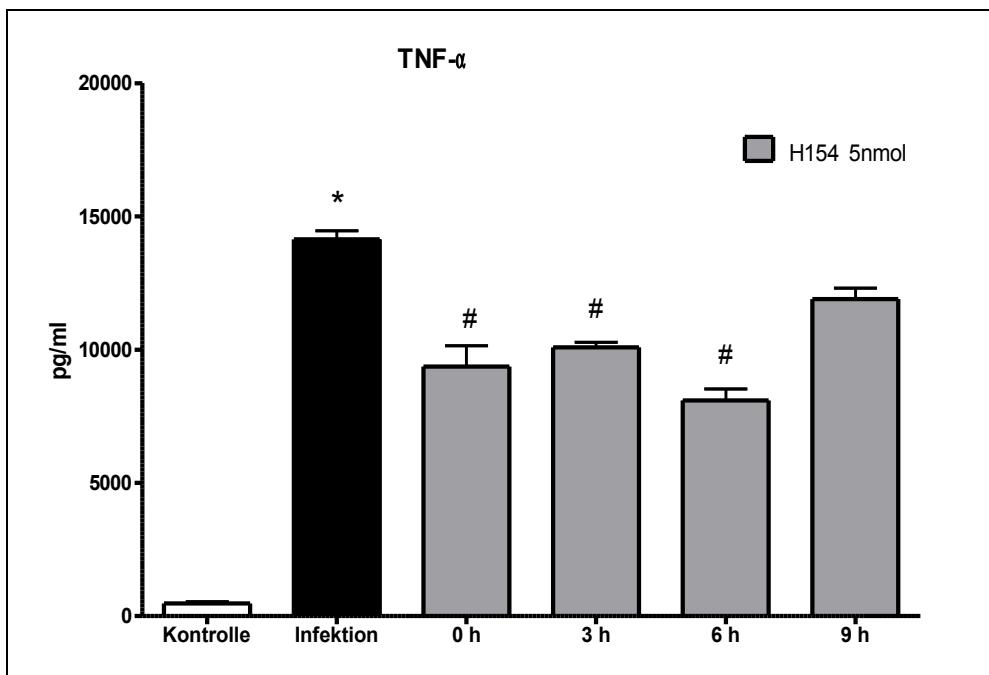


Abbildung 10: TNF- α Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die TNF- α Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Zugabe von H154-Thioat zu den Zeitpunkten 0, 3 und 6 h nach Infektion senkt die TNF- α Konzentration signifikant zum Messzeitpunkt 24 h nach Infektion. Die Zugabe von H154-Thioat 9 h nach Infektion bewirkt keine signifikante Senkung der TNF- α Konzentration (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

4.4.2 Wirkung auf die IL-6 Produktion im Zeitverlauf

Für das Zytokin IL-6 zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch hier senkte H154-Thioat die Protein Konzentration bis zu 6 h nach Infektion mit Darmbakterien, wohingegen nach 9 h keine signifikante Senkung der IL-6 Protein Konzentration mehr erreicht wurde.

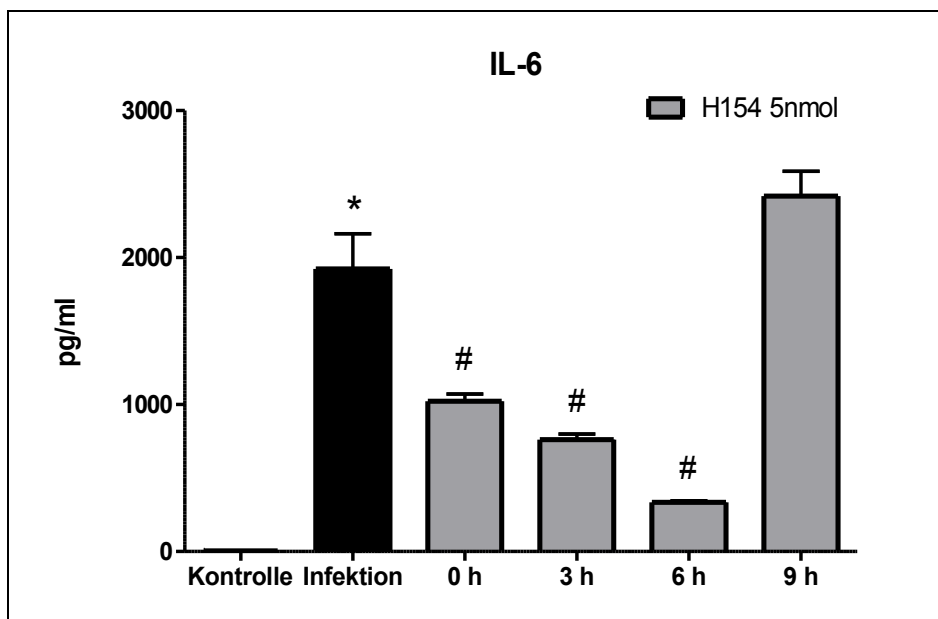


Abbildung 11: IL-6 Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die IL-6 Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Zugabe von H154-Thioat zu den Zeitpunkten 0, 3 und 6 h nach Infektion senkt die IL-6 Konzentration signifikant zum Messzeitpunkt 24 h nach Infektion. Die Zugabe von H154-Thioat 9 h nach Infektion bewirkt keine signifikante Senkung der IL-6 Konzentration (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

4.4.3 Wirkung auf die IL-1 β Produktion im Zeitverlauf

Die Konzentrationsmessungen des Zytokins IL-1 β zeigten, dass H154-Thioat in einer Konzentration von 5 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch eine signifikante Reduzierung der IL-1 β -Freisetzung bei Zugabe bis zu 3 h nach Infektion mit Darmbakterien bewirkt. 6 und 9 h *post infectionem* ließ sich keine signifikante Reduzierung der IL-1 β Protein Konzentration mehr erreichen.

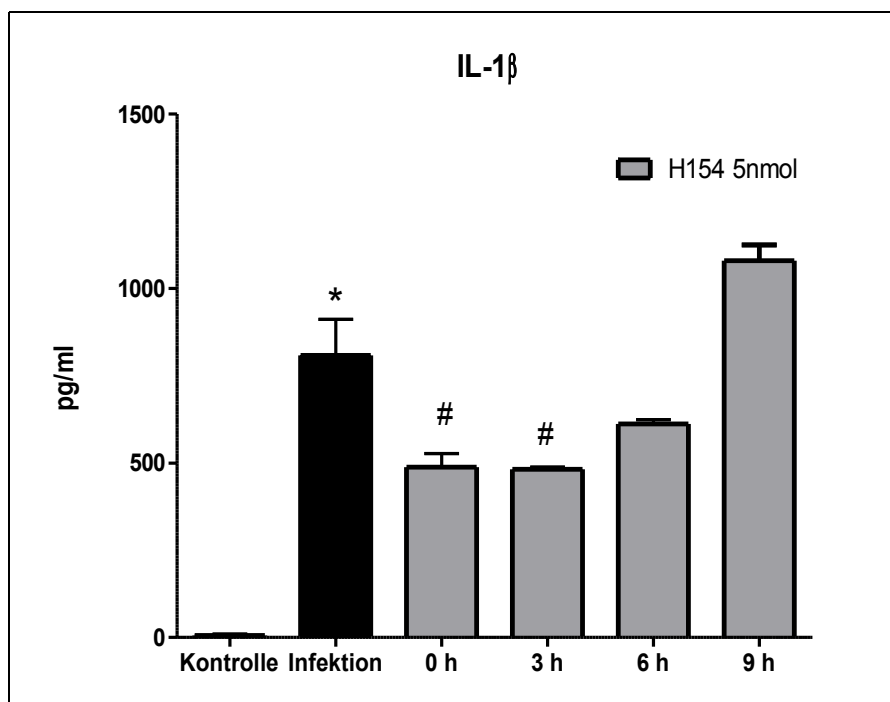


Abbildung 12: IL-1 β Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die IL-1 β Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Zugabe von H154-Thioat zu den Zeitpunkten 0 und 3 h nach Infektion senkt die IL1- β Konzentration signifikant zum Messzeitpunkt 24 h nach Infektion. Die Zugabe von H154-Thioat 6 und 9 h nach Infektion bewirkt keine signifikante Senkung der IL1- β Konzentration (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

4.5 IRS954-Thioat

4.5.1 Wirkung auf die TNF- α Produktion im Zeitverlauf

Für das Oligonukleotid IRS954-Thioat konnte gezeigt werden, dass es in einer Konzentration von 5 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch eine signifikante Reduzierung der TNF- α -Freisetzung bei Zugabe bis zu 9 h nach Infektion mit Darmbakterien erzielt.

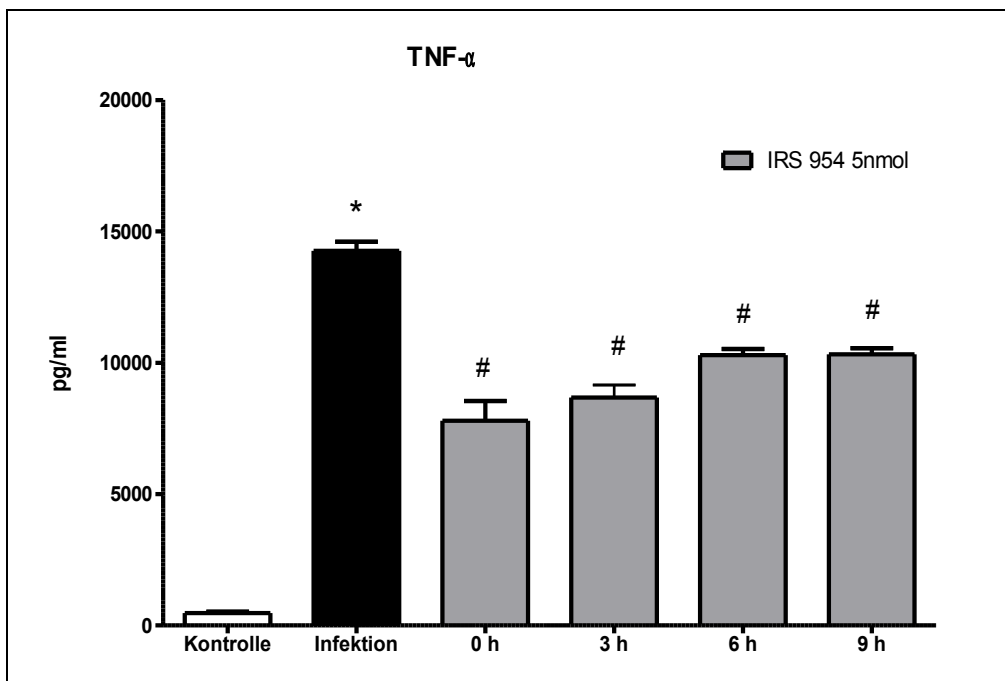


Abbildung 13: TNF- α Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die TNF- α Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Zugabe von IRS954-Thioat zu den Zeitpunkten 0, 3, 6 und 9 h nach Infektion senkt die TNF- α Konzentration signifikant zum Messzeitpunkt 24 h nach Infektion (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

4.5.2 Wirkung auf die IL-6 Produktion im Zeitverlauf

Die Konzentrationsbestimmung des Zytokins IL-6 zeigte, dass IRS954-Thioat in einer Konzentration von 5 nmol pro 900 µl Zell-Bakterien-Gemisch die IL-6 Protein Konzentration nicht hemmt, wenn die Zugabe zeitgleich mit der Infektion erfolgt, wohl aber bei Zugabe 3, 6 und 9 h nach Infektion.

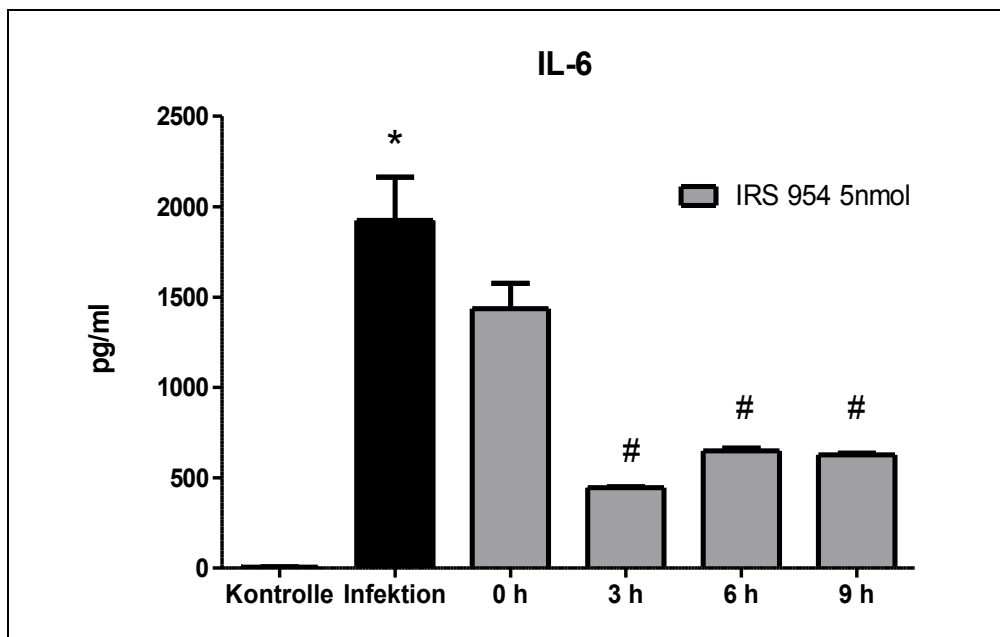


Abbildung 14: IL-6 Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die IL-6 Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Zugabe von IRS954-Thioat zu den Zeitpunkten 3, 6 und 9 h nach Infektion senkt die IL-6 Konzentration signifikant zum Messzeitpunkt 24 h nach Infektion. Die Zugabe von IRS954-Thioat zeitgleich mit der Infektion bewirkt keine signifikante Senkung der IL-6 Konzentration (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

4.5.3 Wirkung auf die IL-1 β Produktion im Zeitverlauf

Die Konzentrationsmessungen des Zytokins IL-1 β zeigten, dass IRS954-Thioat in einer Konzentration von 5 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch eine signifikante Reduzierung der IL-1 β -Freisetzung bei Zugabe bis zu 3 h nach Infektion mit Darmbakterien bewirkt. 6 und 9 h nach Infektion erreichte IRS954-Thioat keine signifikante Reduzierung der IL-1 β Protein Konzentration mehr.

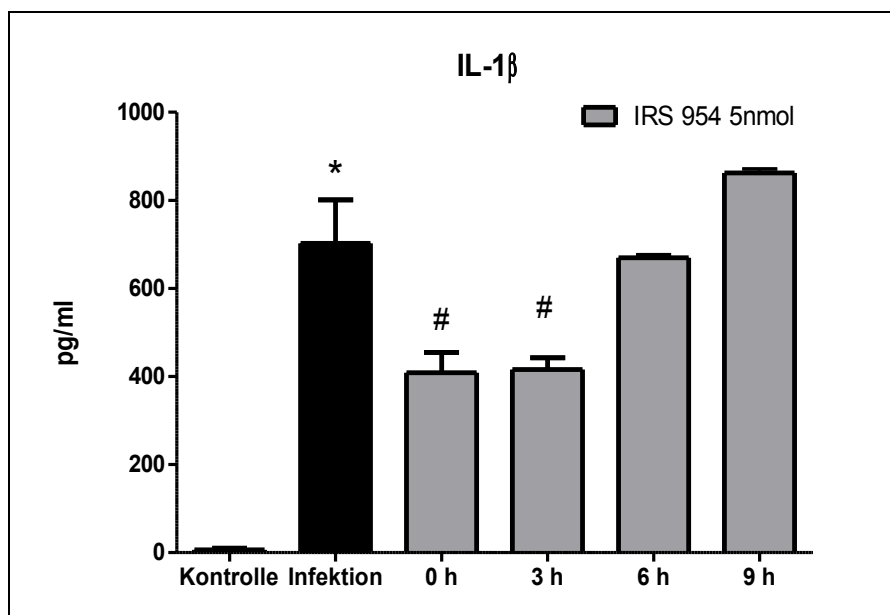


Abbildung 15: IL-1 β Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die IL-1 β Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Zugabe von IRS954-Thioat zu den Zeitpunkten 0 und 3 h nach Infektion senkt die IL1- β Konzentration signifikant zum Messzeitpunkt 24 h nach Infektion. Die Zugabe von IRS954-Thioat 6 und 9 h nach Infektion bewirkt keine signifikante Senkung der IL1- β Konzentration (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

4.6 1612-Thioat

4.6.1 Wirkung auf die TNF- α Produktion im Zeitverlauf

Für das synthetische Oligonukleotid 1612-Thioat zeigte sich in einer Konzentration von 5 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch eine signifikante Reduktion der TNF- α -Freisetzung bei Zugabe bis zu 6 h nach Infektion mit Darmbakterien. 9 h *post infectionem* ließ sich keine signifikante Reduzierung der TNF- α Protein Konzentration mehr erreichen.

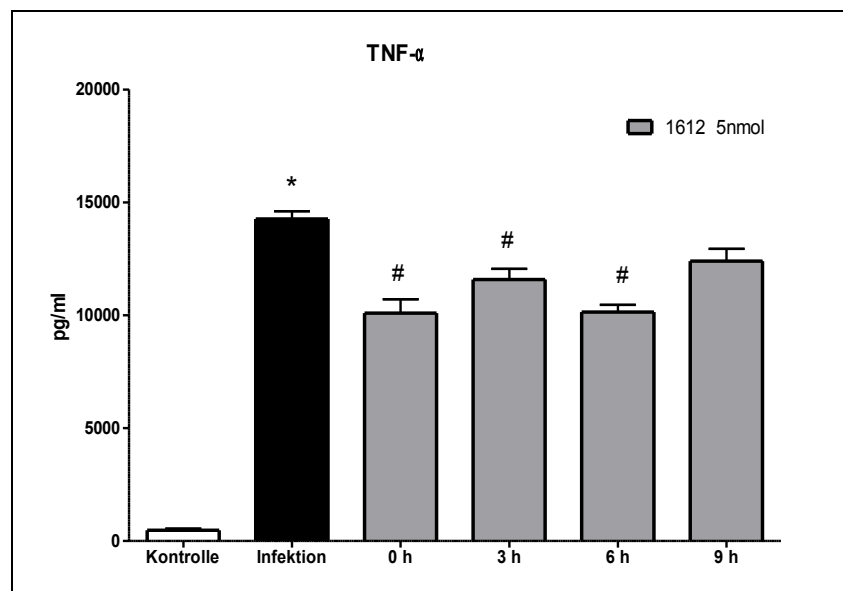


Abbildung 16: TNF- α Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die TNF- α Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Zugabe von 1612-Thioat zu den Zeitpunkten 0, 3 und 6 h nach Infektion senkt die TNF- α Konzentration signifikant zum Messzeitpunkt 24 h nach Infektion. Die Zugabe von 1612-Thioat 9 h nach Infektion bewirkt keine signifikante Senkung der TNF- α Konzentration (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

4.6.2 Wirkung auf die IL-6 Produktion im Zeitverlauf

Die Konzentrationsbestimmung von IL-6 zeigte, dass 1612-Thioat in einer Konzentration von 5 nmol pro 900 µl Zell-Bakterien-Gemisch die IL-6 Konzentration bei zeitgleicher Zugabe mit der Infektion signifikant hemmt. Die poststimulatorische Zugabe von 1612-Thioat senkt die IL-6-Freisetzung nicht.

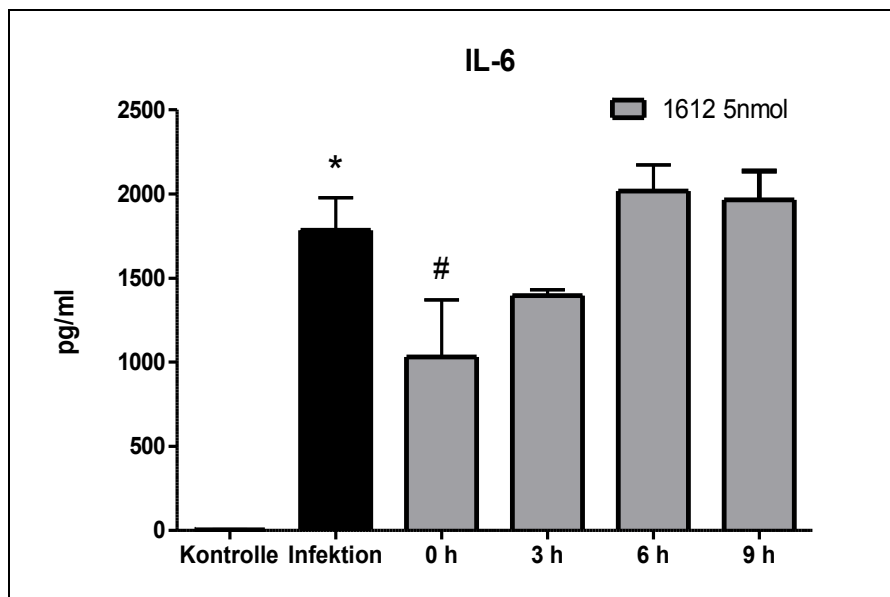


Abbildung 17: IL-6 Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die IL-6 Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Zugabe von 1612-Thioat zeitgleich mit der Infektion senkt die IL-6 Konzentration signifikant zum Messzeitpunkt 24 h nach Infektion. Die Zugabe von 1612-Thioat 3, 6 und 9 h nach Infektion bewirkt keine signifikante Senkung der IL-6 Konzentration (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

4.6.3 Wirkung auf die IL-1 β Produktion im Zeitverlauf

Die Messungen der Konzentration von IL-1 β zeigten, dass 1612-Thioat in einer Konzentration von 5 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch eine signifikante Reduzierung der IL-1 β -Freisetzung bei Zugabe bis zu 3 h nach Infektion mit Darmbakterien bewirkt. 6 und 9 h *post infectionem* senkt 1612-Thioat die IL-1 β Protein Konzentration nicht mehr.

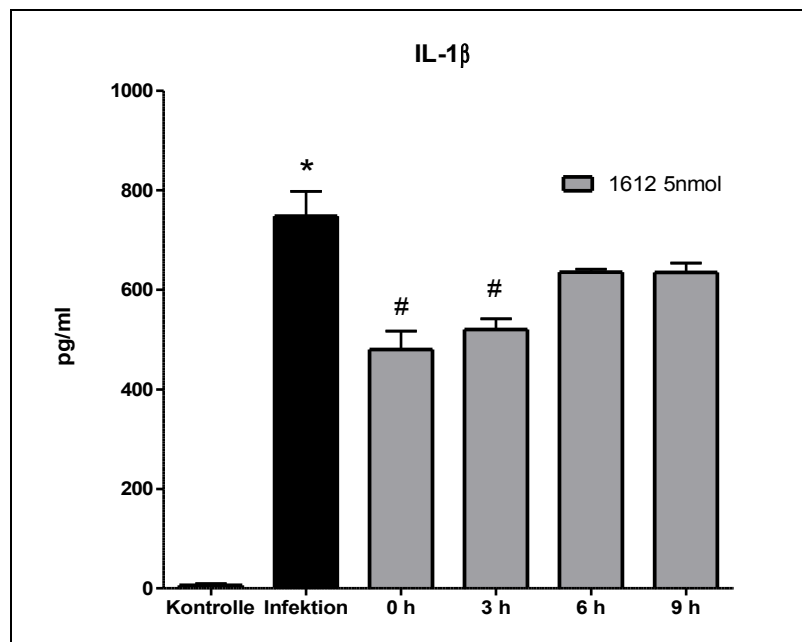


Abbildung 18: IL-1 β Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die IL-1 β Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Zugabe von 1612-Thioat zu den Zeitpunkten 0 und 3 h nach Infektion senkt die IL1- β Konzentration signifikant zum Messzeitpunkt 24 h nach Infektion. Die Zugabe von 1612-Thioat 6 und 9 h nach Infektion bewirkt keine signifikante Senkung der IL1- β Konzentration (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

4.7 Chloroquin

4.7.1 Wirkung auf die TNF- α Produktion im Zeitverlauf

Nach Infektionsinduktion mit hitzeinaktivierten Darmbakterien ist der TLR9-Inhibitor Chloroquin in einer Konzentration von 10 μg pro 900 μl Zell-Bakterien-Gemisch in der Lage, die TNF- α -Expression bis 9 h *post infectionem* signifikant zu reduzieren.

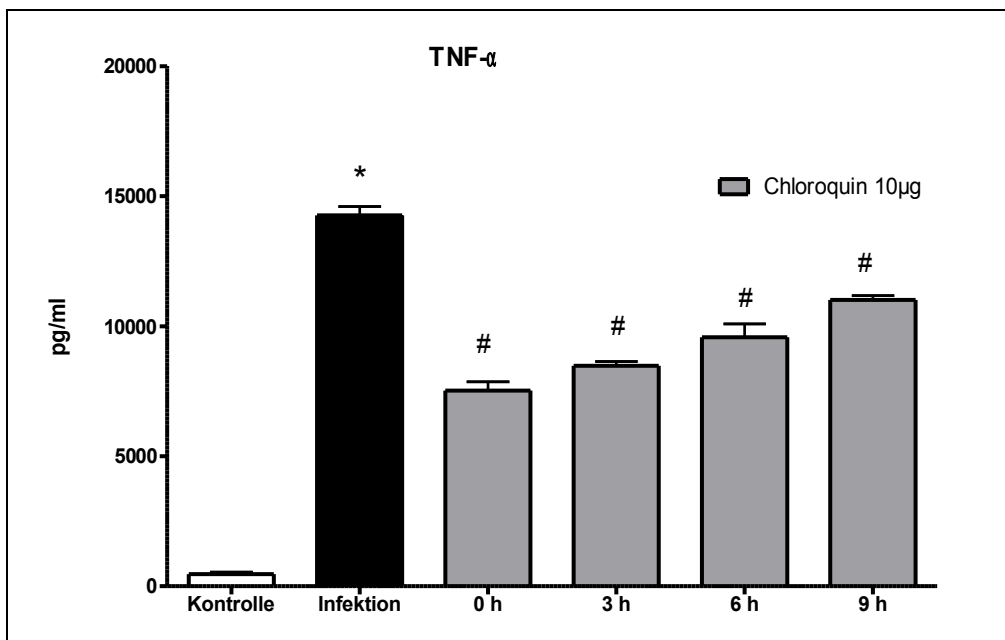


Abbildung 19: TNF- α Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die TNF- α Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Zugabe von Chloroquin zu den Zeitpunkten 0, 3, 6 und 9 h nach Infektion senkt die TNF- α Konzentration signifikant zum Messzeitpunkt 24 h nach Infektion (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

4.7.2 Wirkung auf die IL-6 Produktion im Zeitverlauf

Die Konzentrationsbestimmung von IL-6 zeigte, dass Chloroquin in einer Konzentration von 10 µg pro 900 µl Zell-Bakterien-Gemisch die IL-6 Konzentration bei zeitgleicher Zugabe mit der Infektion sowie 6 h *post infectionem* signifikant hemmt. Die Zugabe von Chloroquin 3 und 9 h nach Infektion senkt die IL-6-Freisetzung nicht signifikant.

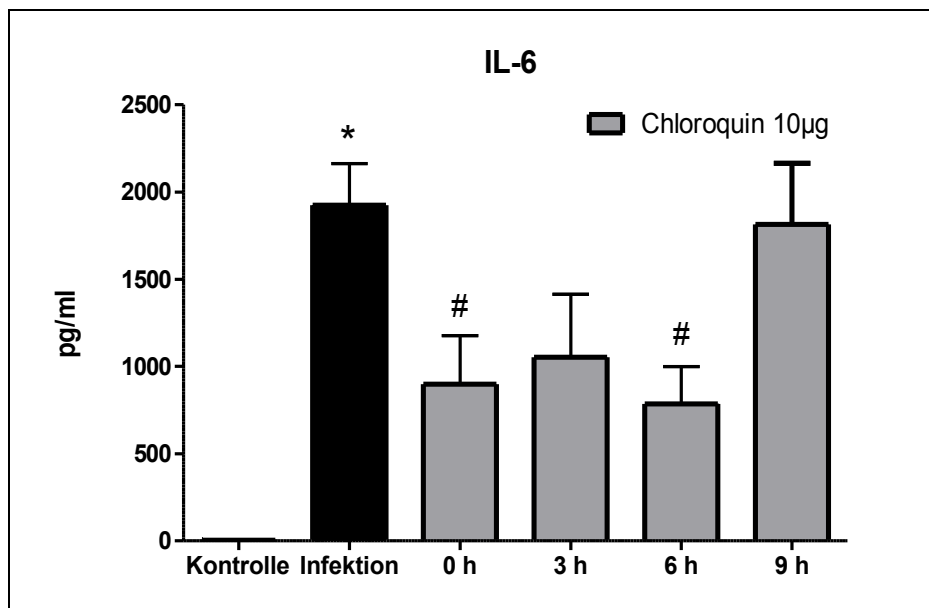


Abbildung 20: IL-6 Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die IL-6 Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Zugabe von Chloroquin zu den Zeitpunkten 0 und 6 h nach Infektion senkt die IL-6 Konzentration signifikant zum Messzeitpunkt 24 h nach Infektion. Die Zugabe von Chloroquin 3 und 9 h nach Infektion bewirkt keine signifikante Senkung der IL-6 Konzentration (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

4.7.3 Wirkung auf die IL-1 β Produktion im Zeitverlauf

Die Konzentrationsmessungen des Zytokins IL-1 β zeigten, dass Chloroquin in einer Konzentration von 10 μg pro 900 μl Zell-Bakterien-Gemisch eine signifikante Reduzierung der IL-1 β -Freisetzung bei Zugabe bis zu 6 h nach Infektion mit Darmbakterien bewirkt. 9 h *post infectionem* ließ sich keine signifikante Reduzierung der IL-1 β Protein Konzentration mehr erreichen.

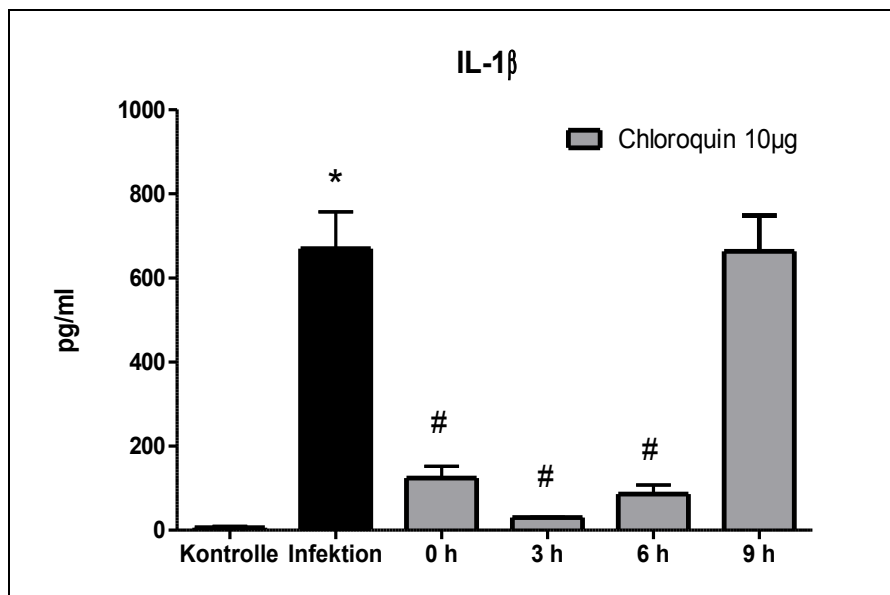


Abbildung 21: IL-1 β Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die IL1- β Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Zugabe von Chloroquin zu den Zeitpunkten 0, 3 und 6 h nach Infektion senkt die IL1- β Konzentration signifikant zum Messzeitpunkt 24 h nach Infektion. Die Zugabe von Chloroquin 9 h nach Infektion bewirkt keine signifikante Senkung der IL1- β Konzentration (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

4.8 Substanzwirkung zum Zeitpunkt 6 h

In der folgenden Abbildung ist die Modulation der TNF- α -Freisetzung aller 4 getesteten Substanzen zum Zeitpunkt 6 h *post infectionem* gezeigt. Zu diesem Zeitpunkt senken alle Substanzen die TNF- α Protein Konzentration signifikant.

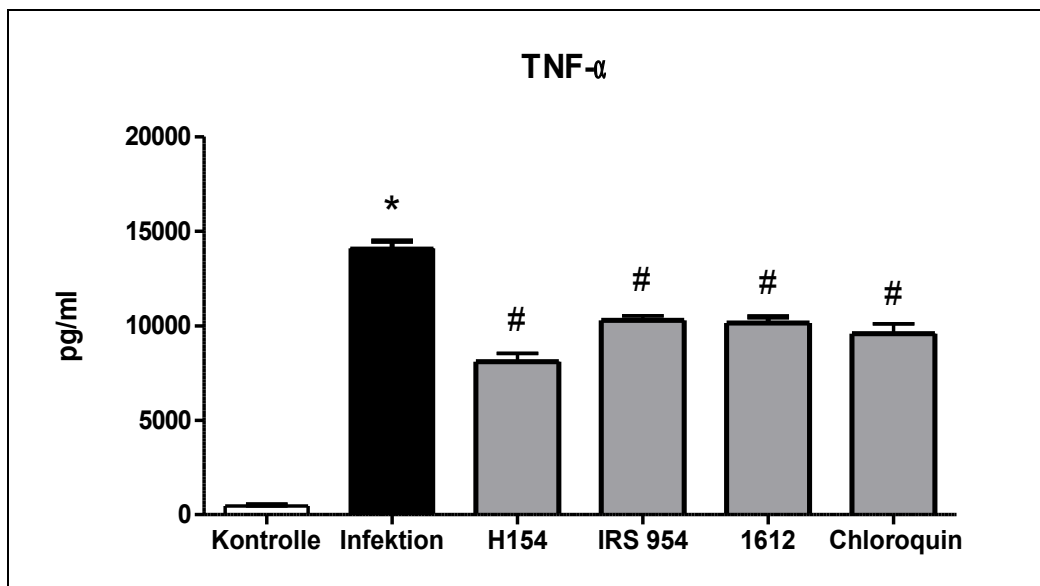


Abbildung 22: TNF- α Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die TNF- α Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Zugabe der synthetischen Oligonukleotide in einer Konzentration von 5 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch und Chloroquin in einer Konzentration von 10 μ g pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch 6 h nach Infektion senkt die TNF- α Konzentration signifikant zum Messzeitpunkt 24 h nach Infektion (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

4.9 Kombination von H154- und IRS954-Thioat

Aufgrund der guten inhibitorischen Einzelwirkungen auf die TNF- α -Freisetzung von H154- und IRS954-Thioat wurde die Wirkung einer Kombination beider Substanzen auf die TNF- α Protein Konzentration untersucht. Entgegen unserer Erwartungen ließ sich die Einzelwirkung beider Substanzen durch Kombination nicht erhöhen. So senken H154- und IRS954-Thioat in einer jeweiligen Konzentration von 5 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch die TNF- α Protein Konzentration lediglich bis zu 3 h *post infectionem*. 6 und 9 h nach Infektion senkt die Substanzkombination die TNF- α -Freisetzung nicht signifikant.

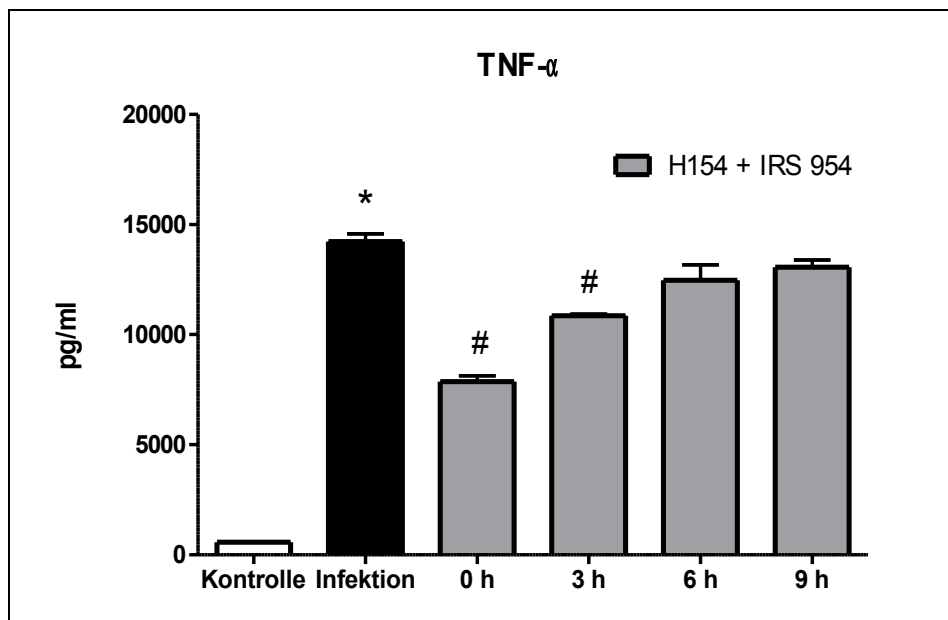


Abbildung 23: TNF- α Protein Konzentration (ELISA). 24 h nach polymikrobieller Infektion (1 Mio Bakterien) ist die TNF- α Protein Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die kombinierte Gabe von H154- + IRS954-Thioat zu den Zeitpunkten 0 und 3 h nach Infektion senkt die TNF- α Konzentration signifikant zum Messzeitpunkt 24 h nach Infektion. Die Zugabe der beiden Substanzen 6 und 9 h nach Infektion bewirkt keine signifikante Senkung der TNF- α Konzentration (*: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. Infektion).

5 Diskussion

Die hier vorgestellte Arbeit ist im Rahmen einer Untersuchungsreihe zu polymikrobiellen Infektionen und deren Abhängigkeit von Toll-like Rezeptoren zu sehen. Sie befasst sich mit der Frage, ob sich durch die pharmakologische Inhibition von TLR9 die inflammatorische Antwort auf einen polymikrobiellen Infektionsreiz reduzieren lässt. Dieser Frage näherten wir uns zunächst *in vitro* in der Zellkultur an einem etablierten Modell mit murinen RAW264.7 Makrophagen. Es wurden vier verschiedene Substanzen bezüglich ihrer Wirkung auf die inflammatorische Antwort untersucht. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf eine mögliche Wirksamkeit zum Zeitpunkt der Infektion und im zeitlich-dynamischen Verlauf *post infectionem* gelegt werden.

Aufgrund von *in vitro* Studien anderer Arbeitsgruppen ist bekannt, dass sich Immunzellen, die mit Hilfe stimulatorischer ODN zur Zytokinproduktion angeregt werden, durch iODN inhibieren lassen (Duramad et al., 2005; Peter et al., 2008; Stunz et al., 2002; Yamada et al., 2002). Diesen Studien ist gemein, dass sie zur Stimulation der Immunzellen jeweils nur eine bestimmte CpG-DNA Sequenz verwendet haben. Diese Vorgehensweise ist wichtig für die Untersuchung einzelner molekularbiologischer Mechanismen, bildet allerdings das komplexe Geschehen einer Sepsis nur unzureichend ab. Ziel unserer Studie war es deshalb, uns den Infektionsbedingungen der polymikrobiellen Sepsis modellhaft zu nähern. Darum verwendeten wir nicht einzelne Erregerbestandteile, bzw. CpG-ODN, sondern hitzeinaktivierte, in ihrer Integrität vollständig erhaltene Bakterien.

Im Rahmen von Pilotversuchen zu dieser Studie stellte sich heraus, dass die verschiedenen genetisch veränderten Mauslinien eine unterschiedliche Bakterienzusammensetzung im Darm besitzen und entsprechend aus dem Darm entnommener Stuhl die Makrophagenkultur nicht im gleichen Maß zur Zytokinproduktion anregte (bisher unveröffentlichte Daten). Für die Versuche dieser Arbeit wurde ausschließlich der Darminhalt von C57BL/6 WT verwendet. Um die basale Zytokinproduktion zu ermitteln, wurden stets Kontrollen mit unstimulierten Makrophagen angefertigt.

Als wichtige Vertreter der Entzündungsreaktion wurden die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 ausgewählt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass hohe Serumkonzentrationen von TNF- α zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität, einer verstärkten

intravasalen Gerinnung, einer ausgeprägten Hypotonie und zu einer verminderten Kontraktilität des Myokards führen, was für die Pathogenese des septischen Schocks von Bedeutung ist und mit einer erhöhten Sterblichkeit korreliert (Dinarello, 1997). Des Weiteren wird TNF- α nach CpG-Stimulation sehr früh hoch reguliert. Klaschik und Mitarbeiter konnten zeigen, dass bereits 30 Minuten nach Behandlung von BALB/c Mäusen mit CpG-ODN mehr als 50% der auswertbaren Gene durch TNF- α reguliert werden. Somit handelt es sich bei TNF- α um einen so genannten „major inducer“. TNF- α wirkt als solcher in einem Zeitraum von 30 Minuten bis neun Stunden nach CpG-Gabe. Auch IL-1 β fungiert als ein solcher „major inducer“ (Klaschik et al., 2009). Es ist seit längerem bekannt, dass sowohl TNF- α als auch IL-1 β einen wesentlichen Einfluss auf die Pathogenese der Sepsis haben (Cain et al., 1999). Sie wirken synergistisch und gelten als Mitverursacher der septischen Kardiomyopathie im Menschen (Kumar et al., 1996). Auch das Zytokin IL-6 wird für viele klinische Symptome der Sepsis verantwortlich gemacht. So konnten bei einer experimentellen Sepsis gastrointestinale Symptome wie Cholestase und bakterielle Translokation (Cerra et al., 1989; Green et al., 1994) und ebenfalls die septisch bedingte Hyperkoagulabilität (Massignon et al., 1994) auf direkte IL-6 Wirkungen zurückgeführt werden. Der IL-6 Spiegel gilt als Parameter für den Schweregrad einer Sepsis (Meisner, 2005).

Getestet wurden die Oligonukleotide H154-, IRS954- und 1612-Thioat und vergleichend dazu das aus der Therapie der Malaria stammende Pharmakon Chloroquin. Bei der Wahl der Zeitpunkte der Substanzapplikation orientierten wir uns an der Vorgehensweise folgender Arbeitsgruppen: In einer Studie mit Splenozyten erzielten die von Yamada et al. getesteten iODN eine Reduktion der IL-6 und IL-12 Produktion bis zu drei Stunden nach Infektion (Yamada et al., 2002). Die Arbeitsgruppe um Stunz et al. verzeichnete eine Hemmung der IL-6 Sekretion in B-Zellen bis vier Stunden *post infectionem* (Stunz et al., 2002), während in einer Arbeit mit Makrophagen das getestete iODN die TNF- α Produktion sogar bis zu sieben Stunden nach Infektion inhibierte (Peter et al., 2008). Wir entschieden in unserer Studie, die zu testenden Substanzen 0, 3, 6 und 9 Stunden *post infectionem* zu applizieren. Mit dieser zeitverzögerten Zugabe sollte getestet werden, ob die Substanzen auch noch nach bereits erfolgter Infektion wirksam sind. Dieses Vorgehen entspricht also modellhaft der pharmakologischen Therapie eines bereits erkrankten Patienten.

Um einen Effekt der verabreichten Volumina auf die Ergebnisse auszuschließen, wurden stets Positivkontrollen angefertigt, denen statt 100 µl der zu testenden Substanz 100 µl Wasser ad injectabile zugefügt wurde. Da eine mögliche Kontamination mit Erregern eine Aktivierung der untersuchten Zellen bewirkt und damit Einfluss auf die Produktion der gemessenen Zytokine zur Folge haben kann, fanden alle Arbeiten unter einer Sterilbank statt.

In der Literatur werden H154- und IRS954-Thioat als TLR9-Inhibitoren beschrieben. Während H154-Thioat als selektiver TLR9-Inhibitor gilt (Yamada et al., 2002), wird IRS954-Thioat von Pawar und Mitarbeitern als hemmend auf die Signaltransduktion sowohl von TLR7 als auch von TLR9 beschrieben und wurde bislang vornehmlich in der Erforschung des *Lupus erythematoses* eingesetzt (Pawar et al., 2007). Hier gilt IRS954-Thioat als vielversprechendes Therapeutikum, da seine Anwendung bei an SLE erkrankten Mäusen zu reduzierten Serumspiegeln an nukleinsäure-spezifischen Autoantikörpern führt, Glomerulonephritis und Endorganschäden reduziert und die Überlebenszeit verlängert (Barrat et al., 2007). In unserem Versuchsaufbau reduziert H154-Thioat die Zytokinfreisetzung in einem Zeitraum bis sechs Stunden *post infectionem*, während IRS954-Thioat die Zytokinfreisetzung sogar neun Stunden nach stattgehabter Infektion noch signifikant hemmte. Diese Wirksamkeit *post infectionem* ist, wie bereits erwähnt, bemerkenswert, da sich daraus Möglichkeiten einer therapeutischen Applikation ergeben könnten.

Im Gegensatz zu den Oligodinukleotiden H154- und IRS954-Thioat wird für 1612-Thioat in der Literatur keine inhibitorische, sondern eine neutrale Wirkung auf TLR9 beschrieben (Klaschik et al., 2009; Yamada et al., 2004;). In seiner Sequenz wurde das immunstimulatorisch wirkende maus-spezifische Hexamer-Motiv 5'-GACGTT-3' (Bauer et al., 2001 b) durch das Hexamer 5'-GATGTT-3' ersetzt. In unserem Versuchsaufbau wirkt 1612-Thioat jedoch nicht neutral, sondern inhibitorisch auf TLR9, und zwar bis zu sechs Stunden *post infectionem*. Auch in *in vivo* Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde eine inhibitorische Wirkung von 1612-Thioat festgestellt (bisher unveröffentlichte Daten). Eventuell lässt sich diese Diskrepanz der erhaltenen Ergebnisse dadurch erklären, dass 1612-Thioat an sich zwar keine inhibitorische Eigenwirkung besitzt, den TLR9 aber kompetitiv besetzt und somit die stimulatorisch wirkende CpG-DNA aus ihrer Bindung verdrängt.

Vergleichend zu den Oligonukleotiden H154-, IRS954- und 1612-Thioat wurde in dieser Studie das Malariamedikament Chloroquin getestet. Chloroquin wird seit langem erfolgreich als Basistherapeutikum bei autoimmunologischen Erkrankungen wie chronischer Polyarthrit und SLE, die durch Autoantikörper gegen DNA charakterisiert sind, eingesetzt (Furst et al., 1999). Es wird angenommen, dass der positive Einfluss von Chloroquin auf der Inhibition der TLR9 abhängigen Stimulation von autoreaktiven B-Zellen beruht (Leadbetter et al., 2002; Viglianti, et al., 2003). Chloroquin akkumuliert im sauren Kompartiment von Lysosomen und neutralisiert als schwache Base den lysosomalen pH-Wert (Macfarlane und Manzel, 1998). Ein saurer lysosomaler pH-Wert um 5,5 ist jedoch für eine starke Bindung zwischen TLR9 und CpG-DNA notwendig (Häcker et al., 1998; Yi et al., 1998). So dissoziiert CpG-DNA bei einem physiologischen pH von 7,4 von ihrem Rezeptor ab. Die Interferenz mit der endosomalen Azidifikation durch Chloroquin hemmt die Zytokinproduktion außerdem durch Suppression der MAPK-Aktivierung. Allerdings stellten Rutz und Mitarbeiter fest, dass Chloroquin den TLR9-Signalweg bereits in Konzentrationen hemmt, die nicht ausreichen, um den lysosomalen pH-Wert zu verändern. Demnach muss Chloroquin auch auf einem anderen Weg inhibitorisch auf TLR9 wirken. Rutz vermutet, dass Chloroquin direkt an TLR9 bindet und als Antagonist wirkt (Rutz et al., 2004). Aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf TLR9 liegt die Fragestellung nahe, ob Chloroquin auch in der Therapie der Sepsis von Nutzen sein könnte. In Untersuchungen *in vivo* konnte bereits gezeigt werden, dass die Gabe von Chloroquin bei CpG-Stimulation zu einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führt (Hong et al., 2004). In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Chloroquin auf die Zytokinfreisetzung *in vitro* untersucht. Es wurde gezeigt, dass Chloroquin bis neun Stunden nach Inkubation mit Darmbakterien in der Lage ist, die inflammatorische Antwort signifikant zu reduzieren. Dies lässt sich mit den von Yasuda et al. aus einem CLP-Modell gewonnenen Ergebnissen in Einklang bringen. Diese Autoren zeigten, dass Chloroquin das Überleben von Versuchstieren signifikant verlängerte, und zwar sowohl bei prophylaktischer als auch bei therapeutischer Applikation bis zu sechs Stunden nach CLP. Der klinische Einsatz von Chloroquin ist demnach sowohl präventiv als auch bei einer neu diagnostizierten Sepsis vorstellbar, z.B. als Bestandteil einer Kombinationstherapie (Yasuda et al., 2008). Hier ist die Entwicklung von Chloroquin-Analoga, die ein verbessertes Inhibitionspotential der TLR9/CpG-DNA Interaktion aufweisen, denkbar. Auch ist es möglich, dass Chloroquin einen

TLR9 unabhängigen Effekt auf die Immunfunktion ausübt. Da es die endosomale Azidifikation hemmt, ist anzunehmen, dass Chloroquin nicht nur auf TLR9 wirkt, sondern ebenfalls auf weitere TLR, die sich im endosomalen Kompartiment befinden (TLR3, 7 und 8) (Heil et al., 2004; Lee et al., 2003; Matsumoto et al., 2003). Somit sieht Yasuda in den iODN potenzielle Pharmaka, die gezielt an TLR9 wirken, wohingegen Chloroquin verschiedene Wege inhibiert, die zum Bild einer polymikrobiellen Sepsis führen (Yasuda et al., 2008). Selbstverständlich muss bei allen Überlegungen die Toxizität von Chloroquin, vor allem auf die Retina (Hobbs et al., 1959), berücksichtigt werden. Hier können Erfahrungswerte aus der Therapie der Malaria und rheumatischer Erkrankungen hilfreich sein.

Diese Arbeit legt den Grundstein für eine Versuchsreihe, die die pharmakologische TLR9-Inhibition auch *in vivo* untersuchen soll. Dies ist notwendig, da das hier vorgestellte *in vitro* Modell eine Reihe von Limitationen aufweist. *In vivo* soll sicher gestellt werden, dass die in der Zellkultur beobachteten Veränderungen auch innerhalb des Gesamtorganismus relevant sind und nicht lediglich Nebenprodukt des Isolierungsprozesses der Zellen oder der *in vitro* Umgebung darstellen (Silliman und Wang, 2005). Auch Halbwertszeiten, individuelle Kinetiken sowie die Art der verwendeten Zellen müssen hinsichtlich der Relevanz von *in vitro* Ergebnissen in Betracht gezogen werden. So werden in diesem Modell Makrophagen als einzige Zellart untersucht und andere, für die Pathophysiologie der Sepsis relevanten Zellen, wie zum Beispiel Kardiomyozyten (Boyd et al., 2006) oder Dendritische Zellen (Efron und Moldawer, 2003), außer Acht gelassen. Auch die Interaktion einzelner Zellen untereinander kann in diesem Modell nicht berücksichtigt werden. Somit kann keine Aussage über die Zytokinproduktion von Makrophagen gemacht werden, die sich im Zellverband innerhalb eines Organismus befinden (Silliman und Wang, 2005). Zu klären bleibt außerdem, inwieweit die Erkenntnisse aus einem Modell mit murinen Zellen auf den Menschen übertragen werden können. So wissen wir, dass Mausmodelle nicht immer die Erkrankung im Menschen exakt abbilden (Joliat und Schultz, 2001). Z.B. unterscheiden sich Mäuse von Primaten im Expressionsmuster ihrer TLR. Im Gegensatz zum Menschen exprimieren Mäuse TLR9 nicht nur in B-Zellen und pDC, sondern auch in Monozyten und in mDC (Hornung et al., 2002; Kadowaki et al., 2001). Somit ist es schwierig, die aus Mausmodellen gewonnenen Erkenntnisse über die Effekte der TLR9-Modulatoren auf deren

Wirkung im Menschen zu übertragen (Krieg, 2007). Hier könnten Versuche *ex vivo* mit humanen Makrophagen von Nutzen sein (Silliman und Wang, 2005).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit zum einen, dass die Stimulation mit hitzeinaktivierten Darmbakterien eine signifikante Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 aus Makrophagen induziert. Zum anderen sind die getesteten pharmakologischen TLR9-Modulatoren dazu in der Lage, die Produktion dieser Zytokine signifikant zu hemmen, und zwar auch noch nach stattgehabter Infektion. Dies ist insofern bemerkenswert als dadurch eine therapeutische Medikation einer bereits manifesten Sepsis möglich sein könnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind im Kontext der Entwicklung einer pharmakologischen Modulation der Inflammation zu sehen, die in Zukunft möglicherweise dazu beitragen könnte, die hohe Mortalitäts- und Morbiditätsrate der polymikrobiellen Sepsis zu reduzieren. Zwar ist davon auszugehen, dass auch weiterhin die kausale und supportive Therapie der Sepsis im Vordergrund stehen wird, doch ist eine adjunktive Therapie mit TLR9-Inhibitoren durchaus vorstellbar und sollte weiterhin Gegenstand intensiver Forschung sein. Hierzu ist die Fortsetzung der Versuche *in vivo* notwendig. Ziel einer adjunktiven Therapie mit TLR9-Inhibitoren wird es sein, die Hyperinflammationsreaktion während des septischen Schocks zu verhindern, ohne die antibakteriellen Abwehrmechanismen des Organismus zu beeinträchtigen.

6 Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Rolle des Toll-like Rezeptors 9 für die Entstehung einer polymikrobiellen Sepsis durch bakterielle DNA und die Möglichkeit seiner pharmakologischen Modulation. Im Verlauf eines septischen Geschehens kann die überschießende Immunantwort, die in der Produktion proinflammatorischer Zytokine mündet, gefährlicher werden als das ursprüngliche Pathogen selbst. In diesem Fall könnte eine effiziente Unterdrückung der initialen Immunantwort von therapeutischem Nutzen sein.

Die DNA von gramnegativen und grampositiven Bakterien ist in der Lage, Zytokine zu induzieren und eine Entzündungsreaktion bis hin zum septischen Schock hervorzurufen. Der spezifische Rezeptor für die Erkennung bakterieller DNA ist der Toll-like Rezeptor 9.

Um die Möglichkeit einer pharmakologischen Modulation der dem TLR9 nachgeschalteten Inflammation *in vitro* zu evaluieren, wurden RAW 264.7 Makrophagen mit hitzeinaktivierten Darmbakterien von C57BL/6 Mäusen inkubiert. Nach 24 h wurden die Proteinkonzentrationen verschiedener proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) im Zellkulturüberstand mittels ELISA detektiert. Zu den Zeitpunkten 0 h, 3 h, 6 h und 9 h *post infectionem* wurden die TLR9-modulierenden Oligonukleotide H154-Thioat, IRS954-Thioat und 1612-Thioat in einer Konzentration von 5 nmol pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch appliziert. Vergleichend dazu wurde das Pharmakon Chloroquin in einer Konzentration von 10 μ g pro 900 μ l Zell-Bakterien-Gemisch zu den o.g. Zeitpunkten getestet. 24 h nach Stimulation mit hitzeinaktivierten Darmbakterien zwecks Simulation einer polymikrobiellen Sepsis zeigte sich eine signifikante Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine aus Makrophagen. H154-Thioat und 1612-Thioat konnten diese Freisetzung in einem Zeitraum bis 6 h, IRS954-Thioat sogar bis 9 h *post infectionem* signifikant reduzieren. Chloroquin war ebenfalls bis 9 h nach Zugabe von Darmbakterien in der Lage, die inflammatorische Antwort signifikant zu reduzieren.

Zusammenfassend konnten unsere Daten zeigen, dass die Inhibition von TLR9 zu einer signifikant verringerten Zytokin-Freisetzung aus Makrophagen im *in vitro* Modell einer polymikrobiellen Infektion führt. Ein besseres Verständnis über die Rolle von TLR9 könnte möglicherweise in der Zukunft eine therapeutische Modulation der inflammatorischen Antwort ermöglichen und so zu einer Senkung der hohen Letalitätsraten der Sepsis beitragen.

7 Literaturverzeichnis

Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406: 782-787

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

Akira S. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Jpn Acad* 2009; 85: 143-156

American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-874

Anderson KV, Nüsslein-Volhard C. Information for the dorsal ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* 1984; 311: 223-227

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29: 1303-1310

Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996; 87: 13-20

Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 2005; 202: 1715-1724

Ballas Z, Rasmussen W, Krieg A. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 1996; 157: 1840-1845

Barrat FJ, Meeker T, Chan JH, Guiducci C, Coffman RL. Treatment of lupus-prone mice with a dual inhibitor of TLR7 and TLR9 leads to reduction of autoantibody production and amelioration of disease symptoms. *Eur J Immunol* 2007; 37: 3582-3586

Bauer M, Redecke V, Ellwart JW, Scherer B, Kremer JP, Wagner H, Lipford GB. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol* 2001 a; 166: 5000-5007

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 b; 98: 9237-9242

Baumann CL, Aspalter IM, Sharif O, Pichlmair A, Bluml S, Grebien F, Bruckner M, Pasierbek P, Aumayr K, Planyavsky M, Bennett KL, Colinge J, Knapp S, Superti-Furga G. Cd14 is a coreceptor of toll-like receptors 7 and 9. *J Exp Med* 2010; 207: 2689-2701

Benimetskaya L, Loike JD, Khaled Z, Loike G, Silverstein SC, Cao L, el Khoury J, Cai TQ, Stein CA.

Mac-1 (CD11b/CD18) is an oligodeoxynucleotide-binding protein. *Nat Med* 1997; 3: 414-420

Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 2010; 32: 305-315

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. *Chest* 1992; 101: 1644-1655

Bone RC. Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definitions. *Ann Intern Med* 1991; 114: 332-333

Bone RC. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: What we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med* 1996; 24: 163-172

Boyd JH, Mathur S, Wang Y, Bateman RM, Walley KR. Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response. *Cardiovasc Res* 2006; 72: 384-393

Brunkhorst FM. Epidemiology, Economy and Practice - Results of the German Study on Prevalence by the Competence Network Sepsis (SepNet). *Anesthesiol. Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2006; 41: 43-44

Brunkhorst FM. Sepsismarker - was ist sinnvoll? *Dtsch med Wochenschr* 2008; 133: 2512-2515

Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, Meng X, Joo KS, Banerjee A, Harken AH. Tumornecrosis factor- α and interleukin-1 β synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med* 1999; 27: 1309-1318

Calandra T, Cohen J. International Sepsis Forum Definition of Infection in the ICU Consensus Conference. The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2005; 33: 1538-1548

Cerra FB, Mazuski JE, Bankey PE, Billiar TR, Holman RT. Role of monokines in altering hepatic metabolism in sepsis. *Prog Clin Biol Res* 1989; 286: 265-277

Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, Yamamoto M, Takeuchi O, Itagaki S, Kumar N, Horii T, Akira S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 2005; 201: 19-25

Coban C, Ishii KJ, Uematsu S, Arisue N, Sato S, Yamamoto M, Kawai T, Takeuchi O, Hisaeda H, Horii T, Akira S. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. *Int Immunol* 2007; 19: 67-79

Copin R, De BP, Carlier Y, Letesson JJ, Muraille E. MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. *J Immunol* 2007; 178: 5182-5191

Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 742-780

Dalpke AH, Zimmermann S, Albrecht I, Heeg K, Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo. *Immunology* 2002; 106: 102-112

Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, de Groote D, Franchimont P, Lamy M. Cytokine serum level during severe sepsis in human, IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg* 1991; 215: 356-362

Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997; 112: 321-329

Dong LS, Ito KJ, Ishii KJ, Klinman DM. Suppressing oligodeoxynucleotides delay the onset of glomerulonephritis and prolong the survival of lupusprone NZB x NZW mice. *Arthritis Rheum* 2004; 52: 651-658

Duramad O, Fearon KL, Chang B, Chan JH, Gregorio J, Coffman RL, Barrat FJ. Inhibitors of TLR-9 Act on Multiple Cell Subsets in Mouse and Man In Vitro and Prevent Death In Vivo from Systemic Inflammation. *The Journal of Immunology* 2005; 174: 5193-5200

Efron P, Moldawer LL. Sepsis and the dendritic cell. *Shock* 2003; 20: 386-401

Emlen W, Pisetsky DS, Taylor RP. Antibodies to DNA. A perspective. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1417-1426

Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007; 33: 606-618

Ewald SE, Lee BL, Lau L, Wickliffe KE, Shi GP, Chapman HA, Barton GM. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 2008; 456: 658-662

Fisher CJ, Opal SM. Role of interleukin-1 and the therapeutic potential of interleukin-1 receptor antagonists in sepsis. *Circ Shock* 1994; 44: 1-8

Furst DE, Lindsley H, Baethge B, Botstein GR, Caldwell J, Dietz F, Ettlenger R, Golden HE, McLaughlin GE, Moreland LW, Roberts WN, Rooney TW, Rothschild B, Sack M, Sebba AI, Weisman M, Welch KE, Yocum D. Dose-loading with hydroxychloroquine improves the rate of response in early, active rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind six-week trial with eighteen-week extension. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 357-365

Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991; 351: 355-356

Gessani S, Testa U, Varano B, Di Marzio P, Borghi P, Conti L, Barberi T, Tritarelli E, Martucci R, Seripa D. Enhanced production of LPS-induced cytokines during differentiation of human monocytes to macrophages. Role of LPS receptors. *J Immunol* 1993; 151: 3758-3766

Graf J, Brunkhorst FM, Reinhart K. Sepsis – Langzeitfolgen und sozioökonomische Bedeutung. *Ärzteblatt Thüringen* 2007; 18: 423-426

Green RM, Whiting JF, Rosenbluth AB, Beier D, Gollan JL. Interleukin-6 inhibits hepatocyte taurocholate uptake and sodium-potassium-adenosinetriphosphatase activity. *Am J Physiol* 1994; 167: 1094-1100

Gursel I, Gursel M, Yamada H, Ishii KJ, Takeshita F, Klinman DM. Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation. *Journal of Immunology* 2003; 171: 1393-1400

Gursel M, Gursel I, Mostowski HS, Klinman DM. CXCL16 influences the nature and specificity of CpG-induced immune activation. *Journal of Immunology* 2006; 177: 1575-1580

Häcker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* 1998; 17: 6230-6240

Halpern MD, Pisetsky DS. In vitro inhibition of murine IFN γ production by phosphorothioate deoxyguanosine oligomers. *Immunopharmacology* 1995; 29: 47-52

Hartmann G, Battiany J, Poeck H, Wagner M, Kerkmann M, Lubenow N, Rothenfusser S, Endres S. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- α induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1633-1641

Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000; 164: 944-953

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

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303: 1526-1529

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem Journal* 1990; 265: 621-636

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

Hirano T. Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 62: 60-65

Hobbs HE, Sorsby A, Freedman A. Retinopathy following chloroquine therapy. *Lancet* 1959; 2: 478-480

Hoffmann MK. Macrophages and T cells control distinct phases of B cell differentiation in the humoral immune response in vitro. *J Immunol* 1980; 125: 2076-2081

Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, Ohba Y, Takaoka A, Yeh WC, Taniguchi T. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and

- IRF-7 in Toll-like receptor signalling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 15416-15421
- Hong Z, Jiang Z, Liangxi W, Guofu D, Ping L, Yongling L, Wendong P, Minghai W. Chloroquine protects mice from challenge with CpG ODN and LPS by decreasing proinflammatory cytokine release. *Int Immunopharmacol* 2004; 4: 223-234
- Hörner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Bardenheuer HJ, Weigand MA. Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis. *Anaesthesist* 2004; 53: 10-28
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer 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
- Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 987-995
- Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4(TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol* 2000; 165: 3541-3544
- Johnston TD, Hampton WW, Fry DE. Septic hemodynamics produced by infusion of endotoxin. *Curr Surg* 1989; 46: 101-103
- Joliat MJ, Shultz LD. The molecular bases of spontaneous immunological mutations in the mouse and their homologous human diseases. *Clin Immunol* 2001; 101: 113-129
- 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
- Kandimalla E.R, Yu D, Zhao Q Agrawal S. Effect of chemical modifications of cytosine and guanine in a CpG-motif of oligonucleotides: structure-immunostimulatory activity relationships. *Bioorg Med Chem* 2001; 9: 807-813
- Kawagoe T, Sato S, Jung A, Yamamoto M, Matsui K, Kato H, Uematsu S, Takeuchi O, Akira S. Essential role of IRAK-4 protein and its kinase activity in Toll-like receptor-mediated immune responses but not in TCR signaling. *J Exp Med* 2007; 204: 1013-1024
- Kawai T, Akira S. TLR signalling. *Cell Death Differ* 2006; 13: 816-825
- Kawai T, Sato S, Ishii K.J, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, Terai K, Matsuda M, Inoue J, Uenatsu S, Takeuchi O, Akira S. Interferon-induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 2004; 5: 1061–1068
- Keane KM, Giegel DA, Lipinski WJ, Callahan MJ, Shivers BD. Cloning, tissue expression and regulation of rat interleukin-1 beta converting enzyme. *Cytokine* 1995; 7: 105-110
- Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, Ploegh HL. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 2008; 452: 234-238
- Klaschik S, Tross D, Klinman DM. Inductive and suppressive networks regulate TLR9-

dependent gene expression in vivo. *J Leukoc Biol.* 2009; 85: 788-795

Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, Sparks LH, Gamble JR, Agosti JM, Waltersdorff AM. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1986; 136: 4220-4225

Klinman DM, Tross D, Klaschik S, Shiota H, Sato T. Therapeutic applications and mechanisms underlying the activity of immunosuppressive oligonucleotides. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1175: 80-88

Knuefermann P, Schwederski M, Velten M, Krings P, Ehrentraut H, Rüdiger M, Boehm O, Fink K, Dreiner U, Grohé C, Hoeft A, Baumgarten G, Koch A, Zacharowski K, Meyer R. Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: role of toll-like receptor 9. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 26-35

Kobe B, Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 2001; 11: 725-732

Krieg AM, Wu T, Weeratna R, Efler SM, Love-Homan L, Yang L, Yi AK, Short D, Davis HL: Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12631-12636

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

Krieg AM. Antiinfective Applications of Toll-like Receptor 9 Agonists. *Proc Am Thorax Soc* 2007; 4: 289-294

Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 709-760

Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JAA, Dzionek A, Pingel JT, Orihuela MM, Akira S, Yokoyama WM, Colonna M. TLR9-Dependent Recognition of MCMV by IPC and DC Generates Coordinated Cytokine Responses that Activate Antiviral NK Cell Function. *Immunity* 2004 b; 21: 107-119

Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 2004 a; 103: 1433-1437

Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α /beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2154-2163

Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S. Pathogen recognition by innate receptors. *J Infect Chemother* 2008; 14: 86-92

Kumar A., Thota V., Dee L., Olson J., Uretz E., Parrillo J. E. Tumor necrosis factor α and interleukin-1 β are responsible for *in vitro* myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996; 183: 949-958

Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and*

Biophysical Research Communications 2009; 388: 621-625

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

Latz E, Verma A, Visintin A, Gong M, Sirois CM, Klein DC, Monks BG, McKnight CJ, Lamphier MS, Duprex WP, Espevik T, Golenbock DT. Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* 2007; 8: 772-779

Leadbetter EA., Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002; 416: 603-607

Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, Raz E, Cottam HB. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 6646-6651

Lee KS, Scanga CA, Bachelder EM, Chen Q, Snapper CM. TLR2 synergizes with both TLR4 and TLR9 for induction of the MyD88-dependent splenic cytokine and chemokine response to *Streptococcus pneumoniae*. *Cell Immunol* 2007; 245: 103-110

Lenert S. Classification, Mechanisms of Action, and Therapeutic Applications of Inhibitory Oligonucleotides for Toll-Like Receptors (TLR) 7 and 9. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 986-996

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31: 1250-1256

Lin L, Gerth AJ, Peng SL. CpG DNA redirects class-switching towards "Th1-like" Ig isotype production via TLR9 and MyD88. *Eur J Immunol* 2004. 34: 1483-1487

Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003; 198: 513-520

Macfarlane DE, Manzel L. Antagonism of Immunostimulatory CpG-Oligodeoxynucleotides by Quinacrine, Chloroquine, and Structurally Related Compounds. *J Immunology* 1998; 160: 1122-1131

Männel DN, Moore RN, Mergenhagen SE. Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor). *Infect Immun* 1980; 30: 523-530

Männel DN, Echtenacher B. TNF in the inflammatory response. *Chem. Immunol* 2000; 74: 141-161

Massignon D, Lepape A, Bienvenu J, Barbier Y, Boileau C, Coeur P. Coagulation/fibrinolysis balance in septic shock related to cytokines and clinical state. *Haemostasis* 1994; 24: 36-48

Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 2003; 171:

3154-3162

Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity. *New Engl J Med* 2000; 343: 338-344

Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91: 295-298

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

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA, Jr. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998; 2: 253-258

Meisner M. Biomarkers of sepsis: clinically useful? *Curr Opin Crit Care* 2005; 11: 473-480

Messina JP, Gilkeson GS, Pisetsky DS. Stimulation of *in vitro* murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J Immunol* 1991; 147: 1759-1764

Most MH, London IM, Kane CA, Lavietes PH, Schroeder EF, Hayman JM. Chloroquine for treatment of acute attacks of vivax malaria. *JAMA* 1946; 131: 963-967

Mui AL, Miyajima A. Cytokine receptors and signal transduction. *Prog Growth Factor Res* 1994; 5: 15-35

Narayanan S, Dalpke AH, Siegmund K, Heeg K, Richert C. CpG oligonucleotides with modified termini and nicked dumbbell structure show enhanced immunostimulatory activity. *J Med Chem* 2003. 46: 5031-5044

O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 353-364

Ohno K, Nakano T, Matsumoto Y, Watari T, Goitsuka R, Nakayama H, Tsujimoto H, Hasegawa A. Apoptosis induced by tumor necrosis factor in cells chronically infected with feline immunodeficiency virus. *J Virol* 1993; 67: 2429-2433

Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 13766-13771

Pawar RD, Ramanjaneyulu A, Kulkarni OP, Lech M, Segerer S, Anders HJ. Inhibition of Toll-like receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1721-1731

Pearson AM, Rich A, Krieger M. Polynucleotide binding to macrophage scavenger receptors depends on the formation of base-quartet-stabilized four-stranded helices. *J Biol Chem* 1993; 268: 3546-3554

Peter M, Bode K, Lipford GB, Eberle F, Heeg K, Dalpke AH. Characterization of suppressive oligodeoxynucleotides that inhibit Toll-like receptor-9-mediated activation of innate immunity.

Immunology 2008; 123: 118-128

Plitas GB, Burt M, Nguyen HM, Bamboat ZM, Dematteo RP. Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis. *J Exp Med* 2008; 205: 1277-1283

Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995; 273: 117-123

Redford TW, Yi AK, Ward CT, Krieg AM. Cyclosporin A enhances IL-12 production by CpG motifs in bacterial DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 1998; 161: 3930-3935

Rothenfußer S, Jahrsdörfer B, Krug A, Endres S, Hartmann G. CpG-Oligonukleotide: Immuntherapie nach dem Muster bakterieller DNA. *Deutsches Ärzteblatt* 2001; 15: 981-985

Rutz M, Metzger J, Gellert T, Lippa P, Lipford GB, Wagner H, Bauer S. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2541-2550

Schottmüller W. Wesen und Behandlung der Sepsis. *Verh Dt Ges Inn Med.* 1914; 16: 215-231

Shirota H, Gursel M, Klinman DM. Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit Th1 differentiation by blocking IFN-gamma-and IL-12-mediated signaling. *J Immunol* 2004; 173: 5002-5007

Siess DC, Vedder CT, Merckens LS, Tanaka T, Freed AC, McCoy SL, Heinrich MC, Deffebach ME, Bennett RM, Hefeneider SH. A human gene coding for a membrane-associated nucleic acid-binding protein. *J Biol Chem* 2000; 275: 33655-33662

Silliman CC, Wang M. The merits of in vitro versus in vivo modeling in investigation of the immune system. *Environ Toxicol Pharmacol* 2006; 21: 123-134

Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Borschert K, Hacker H, Heeg K, Wagner H. Bacterial DNA causes septic shock. *Nature* 1997 a; 386: 336-337

Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Erdmann A, Hacker H, Heeg K, Wagner H. Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. *Eur J Immunol* 1997 b; 27: 1671-1679

Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol* 1996; 157: 2116-2122

Steffen M, Abboud M, Potter GK, Yung YP, Moore MA. Presence of tumour necrosis factor or a related factor in human basophil/mast cells. *Immunology* 1989; 66: 445-450

Stunz LL, Lenert P, Peckham D, Yi AK, Haxhinasto S, Chang M, Krieg AM, Ashman RF. Inhibitory oligonucleotides specifically block effects of stimulatory CpG oligonucleotides in B cells. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1212-1222

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; 101: 3516-3521

Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; 16: 3-9

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-376

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140: 805-820

Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72: 955-962

Trieu A, Roberts TL, Dunn JA, Sweet MJ, Stacey KJ. DNA motifs suppressing TLR9 responses. *Crit Rev Immunol* 2006; 26: 527-544

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

Viglianti GA, Lau CM, Hanley TM, Miko BA, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity* 2003; 19: 837-847

Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med* 1998; 26: 1793-1800

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

Yamada H, Gursel I, Takeshita F, Conover J, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita S, Klinman DM. Effect of suppressive DNA on CpG-induced immune activation. *J Immunol* 2002; 169: 5590-5594

Yamada H, Ishii KJ, Klinman DM. Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit CpG-induced inflammation of the mouse lung. *Crit Care Med* 2004; 32: 2045-2049

Yasuda H, Leelahavanichkul A, Tsunoda S, Dear JW, Takahashi Y, Ito S, Hu X, Zhou H, Doi K, Childs R, Klinman DM, Yuen PS, Star RA. Chloroquine and inhibition of Toll-like receptor 9 protect from sepsis-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294: 1050-1058

Yi AK, Hornbeck P, Lafrenz DE, Krieg AM. CpG DNA rescue of murine B lymphoma cells from anti-IgM-induced growth arrest and programmed cell death is associated with increased expression of c-myc and bcl-xL. *J Immunol* 1996 a; 157: 4918-4925

Yi AK, Klinman DM, Martin TL, Matson S, Krieg AM. Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive

pathway. *J Immunol* 1996 b; 157: 5394-5402

Yi AK, Krieg AM. Rapid induction of mitogen-activated protein kinases by immune stimulatory CpG DNA. *J Immunol* 1998; 161: 4493-4497

Yi AK, Tuetken R, Redford T, Waldschmidt M, Kirsch J, Krieg AM CpG Motifs in Bacterial DNA Activate Leukocytes Through the pH-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *J Immunology* 1998; 160: 4755-4761

Yoneyama M, Fujita T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol* 2010; 20: 4-22

Yu D, Kandimalla ER, Bhagat L, Tang JY, Cong Y, Tang J, Agrawal S. 'Immunomers'--novel 3'-3'-linked CpG oligodeoxyribonucleotides as potent immunomodulatory agents. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 4460-4469

Zeuner RA, Verthelyi D, Gursel M, Ishii KJ, Klinman DM. Influence of stimulatory and suppressive DNA motifs on host susceptibility to inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1701-1707

Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; 303: 1522-1526

Zhu FG, Reich CF, Pisetsky DS. Inhibition of murine dendritic cell activation by synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 1154-1163

Zhu FG, Reich CF, Pisetsky DS. The role of the macrophage scavenger receptor in immune stimulation by bacterial DNA and synthetic oligonucleotides. *Immunology* 2001; 103: 226-234

Zhu J, Huang X, Yang Y. Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways. *J Virol* 2007; 81: 3170-3180

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all denen bedanken, die mich auf vielfältige Weise unterstützt und zu dieser Dissertation beigetragen haben.

Zunächst danke ich Herrn PD Dr. med. Pascal Knüfermann für die Überlassung dieses interessanten Themas. Sowohl bei ihm als auch Herrn PD Dr. med Georg Baumgarten möchte ich mich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für die Bereitstellung der Laboratorien und Untersuchungsmaterialien und für die gute wissenschaftliche Betreuung bedanken. Herzlich bedanke ich mich auch bei Herrn Dr. med. Olaf Boehm, der mir durch seine engagierte und motivierende Betreuung sehr dabei geholfen hat, diese Arbeit zum Abschluss zu bringen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden in den wissenschaftlichen Laboren der medizinischen Poliklinik, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Ralph Lohner, der sich für mich und meine Arbeit eingesetzt hat und ohne dessen Unterstützung ich nicht durchgehalten hätte. Meinen Mitdoktoranden Maria van der Giet und Christoph Brill danke ich für ihre humorvolle Art, die mir den Laboralltag erleichtert hat.

Bei Herrn Henning Begerau möchte ich mich für seine verlässliche Hilfe bei kleinen und großen Formatierungskatastrophen bedanken und für seine Freundschaft. Meinem lieben Opa Herrn Hans Gielen danke ich für das Korrekturlesen und meinem Bruder Sebastian für das Überlassen seiner Wohnung, in der ich gerade diese Zeilen schreibe.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern Frau Birgitta Gielen und Herrn Helmut Gielen, die mir das Medizinstudium und die Promotion erst ermöglicht haben. Ich danke euch für die liebevolle Unterstützung bei allem was ich tue und dafür, dass ich mich immer auf euch verlassen kann.