



Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Laborgruppe Angeborene Immunität (PD Dr. H. Heine)
Abteilung Immunologie und Zellbiologie
(Direktorin: Frau Prof. Dr. Dr. S. Bulfone-Paus)

Erkennung und Aufnahme inflammatorisch aktiver synthetischer Peptidoglykanstrukturen

Inauguraldissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde
der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Lübeck

vorgelegt von
Eva Woelk
aus Hamburg

Lübeck 2005

„Das große Ziel der Bildung ist nicht Wissen, sondern Handeln.“

Herbert Spencer (1820 – 1903)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	6
1 Einleitung	9
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Chemikalien und ihre Bezugsquellen	18
2.1.2 Puffer.....	19
2.1.3 Antikörper.....	19
2.1.3.1 Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated Cell-Sorting, FACS).....	19
2.1.3.2 Konfokale Laserscanningmikroskopie	19
2.1.3.3 Westernblot.....	20
2.1.4 Stimuli	21
2.1.5 Synthetische Peptidoglykanstrukturen.....	22
2.1.6 Medien	23
2.1.7 Phagozytosehemmer und Makropinozytosehemmer	23
2.1.8 Desoxyribonukleotide.....	24
2.1.9 DNA-Polymerasen	24
2.1.10 Plasmide	24
2.1.10.1 TOPO Vektor	24
2.1.10.2 Gateway Expressions-Vektor	25
2.1.10.3 Sonstige Vektoren	25
2.1.11 Bakterien	25
2.1.12 Kits	25
2.1.13 Geräte	25
2.1.14 Sonstiges	26
2.1.15 Zellen und Zelllinien	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Zellbiologische Methoden	27
2.2.1.1 Isolierung verschiedener Zellpopulationen aus humanem Blut.....	27
2.2.1.2 Zellstimulation	28
2.2.1.3 Phagozytose-Assay	28
2.2.1.4 Kinetik am konfokalen Laserscanningmikroskop.....	29
2.2.1.5 Zellzahlbestimmung.....	30
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	30
2.2.2.1 RNA-Isolation.....	30
2.2.2.2 cDNA-Synthese	30
2.2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.2.2.5 DNA-Restriktionsverdau	32
2.2.2.6 TOPO Cloning Kit	33
2.2.2.7 Gateway Technology	35
2.2.2.8 Transformation.....	36
2.2.2.9 Isolierung von DNA aus Bakterienkulturen (Mini- und MidiPrep)	36
2.2.2.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37
2.2.2.11 Aufreinigung und Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	37

2.2.2.12	Sequenzierung.....	37
2.2.2.13	Transfektion von HEK293-Zellen.....	37
2.2.2.14	cDNA-Microarray-Analysen.....	38
2.2.3	Biochemische Methoden.....	38
2.2.3.1	Zytokinbestimmung.....	38
2.2.3.2	Immunofluoreszenzmarkierung für die FACS (Fluorescence-activated Cell-Sorting)-Analyse.....	39
2.2.3.3	Präparation von Zelllysaten für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.2.3.4	SDS-PAGE.....	39
2.2.3.5	Westernblot auf PVDF-Membran und immunhistochemische Färbung.....	39
2.2.3.6	Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen auf einer Nitrocellulose-Membran.....	40
2.2.3.7	Immunhistochemische Färbung von fixierten Zellen für die konfokale Laserscanningmikroskopie.....	40
2.2.4	Statistische Auswertung.....	40
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Inflammatorische Aktivität synthetischer Peptidoglykanstrukturen.....	42
3.1.1	TNF- α -Freisetzung humaner mononukleärer Zellen (MNCs) und Monozyten.....	42
3.2	Untersuchungen des Einflusses inhibitorischer Antikörpern.....	43
3.2.1	TLR2-Abhängigkeit.....	43
3.2.2	CD14-Abhängigkeit.....	44
3.3	TLR2-Abhängigkeit in Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen.....	45
3.4	Stimulation von TLR-transfizierten HEK293-Zellen.....	46
3.5	Nachweis von NOD1 und NOD2 mRNA.....	47
3.6	Generierung von NOD1- und NOD2-Expressionsvektoren.....	48
3.7	Funktionalitätstest der generierten NOD1- bzw. NOD2-Plasmide.....	51
3.7.1	Proteinnachweis von NOD2 im Westernblot.....	51
3.7.2	pcDNA3NOD1 und -NOD2.....	52
3.7.3	pcDNAdest40 NOD1 und -NOD2 sowie pcDNAdest47 NOD1 und -NOD2.....	53
3.8	Einfluss von CD14 auf die Erkennung synthetischer Peptidoglykanstrukturen.....	55
3.9	Untersuchungen antagonistischer Effekte.....	56
3.9.1	Einfluss von TSPentaP auf HEK293-Zellen.....	56
3.9.2	Einfluss von TSPentaP auf humane Monozyten.....	57
3.10	Stimulationskinetik synthetischer Peptidoglykanstrukturen.....	58
3.11	Nachweis der p65-Translokation in Monozyten.....	59
3.12	Nachweis der MAP-Kinase-Aktivierung.....	62
3.13	Phagozytose-Assay.....	64
3.13.1	FACS-Analyse.....	64
3.13.2	Konfokale Laserscanningmikroskopie.....	65
3.13.3	Untersuchungen der p65-Translokation.....	66
3.13.4	TNF- α -ELISA.....	67
3.13.5	Phosphorylierung von MAP-Kinasen.....	70

3.14	Expositionskinetik synthetischer Peptidoglykanstrukturen.....	71
3.15	Lokalisation von NOD2	72
3.15.1	Lokalisation in Monozyten.....	72
3.15.2	Lokalisation in HEK293-Zellen.....	76
3.16	Kinetik des NOD2-GFP-Signals nach Stimulation	79
3.17	Array-Analyse	80
4	Diskussion.....	83
5	Zusammenfassung	95
6	Literatur	97
7	Anhang.....	107
	Abbildungsverzeichnis	107
	Tabellenverzeichnis	111
	Veröffentlichungen	112
	Curriculum Vitae	114
	Danksagung.....	115
	Erklärung	117

Abkürzungen

AK	Antikörper
APC	<i>Antigen-Presenting-Cell</i>
α-	anti-
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
β-2M	β-2 Mikroglobulin
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine-Serum-Albumin</i>
c	Kontrolle
CARD	<i>Caspase-recruitment Domain</i>
Caterpillar	<i>CARD, Transcription Enhancer, R(Purine)-binding, Pysin, lots of Leucine Repeats</i>
CDS	<i>coding sequence</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CIITA	<i>Class II transactivator</i>
CytD	Cytochalasin D
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxyzytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's-Modified-Eagle's-Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Dideoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
DC	<i>Dendritic Cell</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIPA	5-(N-ethyl-N-isopropyl) Amilorid
ELISA	<i>Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay</i>
ER	Endoplasmatische Retikulum
ERK	<i>Extra-Regulated-Protein-Kinase</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii/et altera</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated-Cell-Sorting</i>
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FCS	<i>Foetal Calfserum</i>
g	Erdanziehungskraft (9,81 m/s)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase
GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>
GMFI	<i>Geo Mean Fluorescence Intensity</i>
GMDP	N-acetylglucosaminyln-acetylmuramyl-dipeptid

G418	Genitizin 418
h	<i>hour</i> / Stunde
huPepT1	humaner Di- und Tripeptidtransporter
HS	Humanserum
HBS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
h-MCSF	<i>human Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IκB	<i>Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
IL	Interleukin
IRAK	<i>IL-1-Receptor-Associated-Kinase</i>
JNK	<i>c-Jun-N-Terminal-Kinase</i>
LAL	<i>Limulus ameobocyte lysate</i>
LB Medium	<i>Luria Broth Medium</i>
LBP	<i>Lipopolysaccharide binding protein</i>
LG	L-Glutamin
LP	Lipopeptid
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine-rich Repeat</i>
LTA	Lipoteichonsäure
Malp2	Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid 2kDa von Mykoplasma
MAP	<i>Mitogen-Activated-Proteins</i>
MDC	Monodansylcadaverin
MD-2	<i>Myeloid differentiation protein 2</i>
MDP	Muramyldipeptid
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
MNC	<i>Mononuclear Cell</i>
mRNA	<i>messenger-Ribonucleic -Acid</i>
MyD88	<i>Myeloid-Differentiation-factor-88</i>
NACHT	<i>Domain present in neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), CIITA, HET-E and TP-1</i>
NBD	<i>Nucleotide binding domain</i>
NALP	<i>NACHT-, LRR- and Pyrin domain (PYD)-containing protein</i>
NFκ-B	<i>Nuclear-Factor of kappa light chain enhancer in B cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	<i>NACHT-LRR</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OS	Octasaccharid
OSDiP	Octasacchariddipeptid
p	Plasmid
P3	synthetisches triacetyliertes Lipopeptid
Pam3CSK4	synthetisches triacetyliertes Lipopeptid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PE	Phycoerythrin
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>

PG	Peptidoglykan
sPG	<i>soluble PG</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PS	Penizillin/Streptavidin
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNase	Ribonuklease
Rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
<i>S. friedenau</i>	<i>Salmonella friedenau</i>
syn	synthetisch
synPGs	synthetische Peptidoglykanstrukturen
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TE	Tris-EDTA
T/E	Trypsin-EDTA
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
TIR Domäne	Toll/IL-1 Rezeptor Domäne
TLR	<i>Toll-Like-Receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAM	<i>Trif-related adaptor molecule</i>
TRAF-6	<i>Tumor-necrosis-factor-Receptor-Associated-Factor-6</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor inducing interferon-beta</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethylamin
TS	Tetrasaccharid
TSDiP	Tetrasacchariddipeptid
TSTriP	Tetrasaccharidtripeptid
TSTetraP	Tetrasaccharidtetrapeptid
TSPentaP	Tetrasaccharidpentapeptid
U	<i>Units/Einheiten</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactosid

1 Einleitung

Um eindringende Pathogene und die dadurch hervorgerufenen Krankheiten abzuwehren, hat die Natur jedes mehrzellige Lebewesen mit der Fähigkeit ausgestattet, diese Krankheitserreger zu erkennen, zu eliminieren und das eigene Gewebe dabei zu schützen. Dabei sind die Verteidigungsmechanismen evolutionär unterschiedlich weit entwickelt. Selbst Pflanzen¹, Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*)² und Muscheln³ verfügen über einen Mechanismus, eingedrungene Pathogene wie Bakterien, Viren und Pilze als „fremd“ zu identifizieren und sie effizient zu bekämpfen. Das Immunsystem der Vertebraten ist dagegen komplexer und spezifischer als das der anderen Lebewesen. Durch die Evolution konnte sich im Laufe der Zeit ein System aus pathogen-spezifischen Erkennungsproteinen entwickeln und etablieren, das neben dem ursprünglicheren angeborenen Immunsystem eine zweite Komponente des Immunsystems, die erworbene oder adaptive Immunität, darstellt. Diese adaptive Immunität zeichnet sich durch die Bekämpfung von Infektionen mit spezifischen Antikörpern aus, die ein Mensch im Laufe seines Lebens durch Konfrontationen mit pathogenen Krankheitserregern bildet. Diese Spezifität des erworbenen Immunsystems wird unter anderem durch die Vielfalt der durch somatische Rekombination entstandenen Antikörper sowie durch das „immunologische Gedächtnis“ erreicht^{4;5;6}. Darunter versteht man die Fähigkeit des Immunsystems, schnell und effektiv auf Krankheitserreger zu reagieren, mit denen es zuvor Kontakt hatte. Die Fähigkeit beruht auf der Tatsache, dass eine sich klonal vermehrende Population antigenspezifischer Lymphozyten effektiv auf Pathogene reagieren kann.

Das angeborene Immunsystem hingegen ist der evolutiv ursprünglichere Teil des Verteidigungssystems des Wirtes. Es besteht aus zellulären und humoralen Komponenten, die sich jeweils wiederum in erkennende und ausführende Elemente untergliedern lassen⁷. Zu den humoralen erkennenden Komponenten zählen unter anderem das *Lipopolysaccharid Binding Protein* (LBP)⁸ und das C-reaktive Protein⁹, welches direkt an Mikroorganismen bindet. Zu den ausführenden Elementen der humoralen Komponenten zählen z. B. das Enzym Lysozym¹⁰, das die Zellwand Gram-positiver und Gram-negativer Mikroorganismen durch enzymatische Mechanismen zerstört, sowie das aus einem Set von mehr als 30 Proteinen bestehende Komplementsystem. Die zellulären Komponenten bestehen aus den zu den Leukozyten zählenden Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen (DCs), Mastzellen, Neutrophilen, Eosinophilen und natürlichen Killerzellen (NK Zellen). Darüber hinaus können die Haut sowie die Epithelien der Lunge und des Darms als Gewebe mit Fähigkeiten des angeborenen Immunsystems angesehen werden⁷. Die erkennenden Elemente der zellulären Komponenten sind dabei die Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors* [PRRs]), welche spezifische *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMPs) erkennen. Als ausführende Elemente der zellulären Komponenten können die von Makrophagen und Neutrophilen produzierten reaktiven Sauerstoffmetabolite angesehen werden. Sie werden nach der Phagozytose pathogener Keime in den Phagosomen dieser Zelle gebildet, um die Bakterien zu eliminieren⁷.

Toll-like Rezeptoren (TLRs) als *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) auf Immunzellen des angeborenen Immunsystems

Die Erkennung der PAMPs durch die auf den Makrophagen und DCs befindlichen PRRs aktiviert verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege, welche eine Induktion von inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Typ-I Interferone (IFN- α und INF- β) sowie die Reifung von DCs hervorrufen, und dadurch das adaptive Immunsystem aktivieren¹¹. Die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs) spielt dabei eine wichtige Rolle.

1996 wurde das *Drosophila melanogaster*-Protein Toll, welchem zuvor nur eine Rolle bei der Entwicklung der *Drosophila*-Larve zugeschrieben wurde, als wichtiges Protein der Immunantwort von *Drosophila melanogaster* gegen *Aspergillus fumigatus* identifiziert¹². Zwei Jahre später konnten Poltorak *et al.*¹³ zeigen, dass das humane Homolog TLR4 der Rezeptor für das aus der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien stammende Lipopolysaccharid (LPS) ist und dass die Aktivierung dieses Rezeptors die Expression von inflammatorischen Genen induziert¹⁴. Bei der Erkennung von LPS spielen neben TLR4 auch das lösliche LBP, das in der Zellmembran verankerte Molekül CD14 sowie das Protein MD-2 eine wichtige Rolle. Alle drei Moleküle sind Komponenten des so genannten LPS-Rezeptor-Komplexes¹⁵⁻¹⁷.

Insgesamt sind bis heute 11 humane TLRs identifiziert worden, wobei TLR1-9 spezifische, konservierte mikrobielle Moleküle erkennen und dadurch kollektiv eine Erkennung von nahezu allen pathogenen Organismen von Protozoen über Bakterien und Pilzen bis hin zu Viren ermöglichen¹⁸. Der Ligand für TLR10 ist bis heute nicht identifiziert worden, und TLR11 wird aufgrund des Vorhandenseins eines Stop-Codons im TLR11-Gen im humanen System nicht exprimiert. TLR11-defiziente Mäuse hingegen weisen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber uropathogenen Mikroorganismen auf¹⁹. Als Beispiel eines gut untersuchten Toll-like Rezeptors im humanen und murinen Modell dient neben dem bereits erwähnten TLR4 der Toll-like Rezeptor 2, der Lipoproteine und Lipopeptide Gram-positiver Bakterien sowie das *Makrophagen-aktivierende Lipopeptid 2kDa* (MALP-2) von Mykoplasmen erkennt²⁰. Darüber hinaus scheint TLR2 mit TLR6 bzw. TLR1 zu interagieren, um zwischen verschiedenen Lipopeptiden unterscheiden zu können²¹. Eine Erkennung von Zymosan, einem Zellwandbestandteil der Hefe, erfolgt durch die Interaktion von TLR2 und Dectin-1, einem Rezeptor der Familie der Lectine¹¹. Eine Übersicht aller humanen TLRs und ihrer Liganden ist nachfolgend tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 1: Tabelle der humanen Toll-like Rezeptoren 1-10 (TLRs) und ihrer bekannten Liganden

Toll-like Rezeptor	Ligand	Referenz
TLR1 (+TLR2)	Lipopeptide	21
TLR2	Lipoteichonsäuren (LTA); Pam3CSK4; MALP-2; Zymosan; Lipopeptid (LP)	11;20-22
TLR3	Doppelstrang RNA; Poly I:C mRNA	23
TLR4	Lipopolysaccharid (LPS)	15;16
TLR5	Flagellin	24
TLR6 (+TLR2)	Lipopeptide	21
TLR7	Einzelstrang-RNA; kleine antivirale Komponenten (Imiquimod, Resiquimod)	25
TLR8	Einzelstrang-RNA; kleine antivirale Komponenten (Imiquimod, Resiquimod)	25
TLR9	unmethylierte CpG DNA.	24;26
TLR10	unbekannt	-

Da TLR3, TLR7/8 und TLR9 an der Erkennung bakterieller und viraler Nukleinsäuren beteiligt sind und diese Nukleinsäuren nach der Internalisation und dem Transport der Bakterien und Viren in den Endosomen freigesetzt werden, sind TLR3, TLR7/8 und TLR9 im Vergleich zu den extrazellulär exprimierten TLRs in endosomalen Kompartimenten der Zelle lokalisiert²⁶.

TLRs gehören zur Familie der Typ-I Transmembranrezeptoren, welche durch eine extrazelluläre *Leucine-rich repeat* (LRR)-Domäne sowie eine intrazelluläre Toll/IL-1 Rezeptor (TIR)-Domäne charakterisiert sind²⁷. LRRs sind für die Ligandenerkennung in Proteinen verantwortlich. Die TIR-Domäne tritt dagegen als konserviertes Protein-Protein Interaktionsmodul auf, welches in vielen TIR-Domänen beinhaltenden Proteinen bei Pflanzen und Tieren eine wichtige Rolle bei der Wirtsverteidigung spielt²⁷⁻³⁰. Infolge der Erkennung von PAMPs durch TLRs wird durch die Assoziation der TIR-Domäne mit TIR-Domänen anderer intrazellulärer Adaptormoleküle die Signaltransduktion induziert. Die Assoziation der beiden TIR-Domänen rekrutiert wiederum Proteine der *IL-1 receptor-associated kinase* (IRAK)-Familie, die unter anderem über die *Mitogen-activated Protein* (MAP) Kinase-Signalwege den *Nuclear Factor* (NF)- κ B aktiviert. Dies führt schließlich zu einer Genexpression von verschiedenen inflammatorischen Zytokinen (z. B. Tumor-Nekrosefaktor- α [TNF- α]), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-1 β (IL-1 β).

Die Caterpillar-Familie und ihre Funktion bei der angeborenen Immunität

Neben der Familie der TLRs wurde kürzlich eine weitere Proteinfamilie mit einer aus LRRs bestehenden Domäne entdeckt². Wie bereits bekannt ist, spielt die LRR-Domäne der Toll-like Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Ligandenerkennung, und auch bei der neu entdeckten Familie der Caterpillar (*CARD, Transcription Enhancer, R(purine)-binding, Pyrin, Lots of Leucine Repeats*)-Proteine scheint diese Domäne ausschlaggebend für deren Funktion zu sein. Demnach handelt es sich bei den Caterpillar-Proteinen um eine große Gruppe intrazellulärer Proteine, denen eine Beteiligung an der Erkennung bakterieller Virulenzfaktoren zugeschrieben wird. Ihnen gemeinsam ist das Vorhandensein N-terminaler Effektor-domänen, einer *Nucleotide-binding Domain* (NBD) und C-terminaler LRR. Diese Proteine zeigen in ihrer Struktur eine bemerkenswerte Ähnlichkeit mit den *disease resistance* (R)-Proteinen der Pflanzen, die für die Vermittlung der pflanzlichen Immunantwort gegenüber Bakterien, Viren, Pilzen, Nematoden, Insekten und auch synthetischen Produkten wie Insektiziden verantwortlich sind²⁹ (Abbildung 1).

In Abbildung 1 ist zu erkennen, dass die N-terminale Effektor-domäne aus einer Pyrin-, CARD- (*caspase-recruitment domain*) oder Transaktivator-domäne bestehen kann, die für homotypische und heterotypische Interaktionen zwischen Proteinen verantwortlich sind. Die darauf folgende NBD reguliert die Selbst-Oligomerisation der Proteine und wird durch NACHT (*neuronal apoptosis inhibitory protein* (NAIP), CIITA, HET-E und TP-1)- oder NOD (*nucleotid oligomerisation domain*)-Domänen gebildet. Nachfolgend weisen die meisten Proteine der Caterpillar-Familie C-terminal zur NBD eine *NACHT-associated Domain* (NAD) auf. Der C-Terminus besteht aus LRRs, welche eine Funktion in der Ligandenbindung und Protein-Protein Interaktion spielen³¹. Als erstes der Caterpillar-Genfamilie zugehöriges Mitglied wurde der *class II transactivator* (CIITA) beschrieben. CIITA ist ein Transkriptionsregulator der *Major histocompatibility complex II* (MHCII)-Gene, und ein Defekt in diesem Gen wird in Verbindung mit einer immundefizienten Fehlfunktion, bekannt als das *Type II Bare Lymphocyte*

Syndrome, gebracht ^{31;32}. Diese Beobachtung impliziert, dass die Familie der Caterpillar-Proteine eine wichtige Rolle in der Regulation von Entzündungen, Immunantworten und dem Zelltod spielt ^{29;31}. Basierend auf den LRR- und NBD-Sequenzen konnten in von Ting *et al.* ^{29;31} und Harton *et al.* ³³ durchgeführten Genomdatenbankrecherchen über 20 weitere bekannte und neue Mitglieder dieser Genfamilie identifiziert werden.

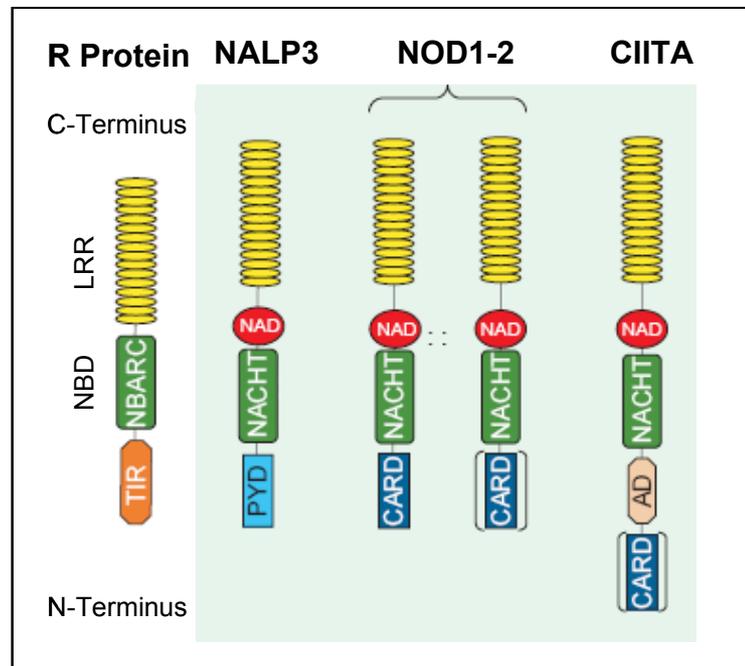


Abbildung 1: Domänenstruktur der NLR-Familie (zum Vergleich ist ein R Protein der Pflanzen aufgezeigt) (modifiziert nach Martinon, *Trends in Immunology*, 2005; 447)

Nach heutigem Kenntnisstand bezeichnet man eine wichtige Gruppe innerhalb der Caterpillar-Familie als die NACHT-LRRs oder auch NOD-LRRs (NLRs) ^{2;34}. Sie beinhalten die Proteine mit den aus NOD- oder NALP-(*NACHT*-, *LRR*-, and *pyrin domain (PYD)*-containing proteins)-Domänen bestehenden NBDs. Zu den wichtigsten Vertretern zählen NOD1 (CARD4), NOD2 (CARD15) und NALP3 (Cryopyrin) ³². NOD1 besteht aus einer (NOD2 aus zwei) N-terminalen CARD Domäne, einer intermediären NOD Domäne und C-terminalen LRRs. NALP3 dagegen weist statt der CARD Domäne eine Pyrin-Domäne (PYD) auf.

Eine wichtige Beobachtung brachten die NOD-Proteine in Verbindung mit der Erkennung intrazellulärer Pathogenitätsfaktoren: Eine signifikante Anzahl von Patienten mit der familiären Form von Morbus Crohn, einer chronischen entzündlichen Darmerkrankung, weisen Mutationen im NOD2-codierenden Gen *CARD15* auf ³⁵⁻³⁷. Eine *Frameshift*-Mutation (ein durch eine Cytosin-Insertion an Position 1007 verursachtes Stop-Codon) und zwei *Missense*-Mutationen (Gly908Arg und Arg702Trp) wurden dabei mit Morbus Crohn assoziiert ^{36;38;39}. Eine homozygote Mutation erhöht dabei das Risiko um das 20-40fache, die Krankheit Morbus Crohn zu entwickeln.

Die mit Morbus Crohn in Verbindung gebrachten Mutationen im NOD2-Protein implizieren zwei theoretische Modelle der Auswirkung auf das Immunsystem. Im ersten Modell wird vermutet, dass die durch NOD2-Mutationen verursachte fehlende Erkennung von mikrobiellen Bestandteilen eine sekundäre Inflammation im Intestinaltrakt als Antwort auf überzählige Bakterien oder bakterielle Produkte in

der Lamina Propria auslöst. In diesem Modell wird NOD2 eine protektive Rolle in der Wirtsverteidigung zugeschrieben, wobei die Krankheit, verursacht durch ineffektive Bakterienerkennung, einen Defekt des angeborenen Immunsystems darstellt. Im zweiten Modell wird NOD2 eine negativ-regulierende Rolle bei der Antwort auf Bakterien zugeschrieben. Dabei soll eine NOD2-Mutation eine unzureichende T-Zell-Aktivierung im Intestinalgewebe hervorrufen. Watanabe *et al.*⁴⁰ konnten zeigen, dass Makrophagen von NOD2-defizienten Mäusen erhöhte Level des inflammatorischen T_H1-polarisierenden Zytokins IL-12 als Antwort auf TLR2-Stimuli sekretieren. Dagegen stellte Netea *et al.*⁴¹ bei Patienten mit einer homozygoten Mutation im NOD2-Gen eine geringere Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 nach TLR2-Stimulation fest. Die Untersuchungen implizieren, dass zur Verifizierung dieser Modelle und zum Verständnis, inwieweit die NOD2-Mutationen zur Entwicklung der Krankheit Morbus Crohn beitragen, weitere Versuche nötig sind.

Die Tatsache, dass neben CIITA auch NOD2 mit immundefizienten Krankheiten in Verbindung gebracht wird, impliziert, dass NLRs als eine wichtige Gruppe von Proteinen angesehen werden müssen, die neben den TLRs eine bedeutende Rolle in der intrazellulären Vermittlung von Immunantworten spielen.

Erkennung mikrobieller Membrankomponenten durch NOD1 und NOD2

Unter normalen Umständen leben ca. 10^{14} Bakterien in Koexistenz mit dem menschlichen Körper. Ohne uns zu schaden, besiedeln sie den „externen Lebensraum“ wie die Haut, den Verdauungstrakt und die oberen Atemwege. Sobald aber die Schwelle zum sonst sterilen „internen Lebensraum“ überschritten wird, treten erste Immunreaktionen auf. Der Körper erkennt die Bakterien, bekämpft sie und behebt eventuell am eigenen Gewebe auftretende Schäden⁴². Ist der Körper z. B. durch immundefiziente Krankheiten geschwächt, können sich Pathogene im Körper ohne große Gegenwehr ausbreiten, was zur Ausbildung einer Sepsis bzw. zu einem septischen Schock führen kann⁴³. Hauptauslöser der im Rahmen einer Sepsis induzierten Produktion zuerst proinflammatorischer und später antiinflammatorischer Zytokine ist neben dem bereits erwähnten LPS als Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien unter anderem das bakterielle Peptidoglycan (PG)⁴⁴. PG spielt aber nicht nur bei der Entstehung der Sepsis eine wichtige Rolle, sondern ist auch bei den durch immundefizienten Krankheiten hervorgerufenen Inflammationen involviert. So spielt das PG-Fragment Muramyl-dipeptid (MDP) und dessen Erkennung über das intrazelluläre Protein NOD2 bei der Entwicklung der chronischen Darmentzündungskrankheit Morbus Crohn beteiligt.

Inohara *et al.*⁴⁵, Ogura *et al.*³⁸, Girardin *et al.*⁴⁶ und Berrebi *et al.*⁴⁷ konnten zeigen, dass NOD1 und NOD2 als intrazelluläre PRRs bakterielles Peptidoglykan über ihre carboxy-terminal LRRs erkennen. Peptidoglykan ist eine wichtige Komponente der bakteriellen Zellwand und besteht aus Zuckerketten mit alternierenden N-Acetylglucosaminsäure (GlcNAc) und N-Acetylmuramylsäure (MurNAc) Disaccharid-Untereinheiten, welche über kurze Peptidseitenketten miteinander quervernetzt sind (Abbildung 2). Dabei ist die Aminosäurezusammensetzung der Peptidketten nach den ersten Aminosäuren (AS) L-Alanin (L-Ala), D-Glutamin (D-Glu), L-Lysin (L-Lys) und D-Alanin (D-Ala) spezie-spezifisch⁴². Biochemische und funktionelle Analysen haben dabei das MDP als essenzielle Struktur der Peptidoglykanerkennung durch NOD2 identifiziert, welches allen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien gemeinsam ist (siehe Abbildung 3)^{46;48}. Daher kann NOD2 als genereller Sensor für Bakte-

rien angesehen werden, da MDP innerhalb der Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien ein hochkonserviertes Molekül darstellt. NOD1 dagegen erkennt Peptidoglykanmoleküle, in denen die *meso*-Diaminopimelinsäure (*meso*-DAP) vertreten ist ^{49;50}. Diaminopimelinsäure kommt nur in der Zellwand Gram-negativer Bakterien und einiger weniger Gram-positiver Bakterien wie den Gattungen *Bacillus* und *Listeria* vor. Analysen mit synthetischen Komponenten identifizierten das Dipeptid γ -D-Glutamyl-*meso*-DAP (ie-DAP) als minimale Struktur, welche eine NOD1-Aktivierung auslösen kann (Abbildung 2) ^{49;51}.

Die zelluläre Aufnahme der NOD1- bzw. NOD2-Agonisten in die Zelle ist bis heute nicht geklärt. Eine Beteiligung von aktiven Aufnahmeprozessen z. B. unter Mitwirkung des Zytoskeletts und inaktiven Aufnahmeprozessen, wie Diffusion, könnten bei der Erkennung von NOD-Agonisten durch Immunzellen eine wichtige Rolle spielen. Die Phagozytose könnte als aktiver Aufnahmeprozess phagozytischer Zellen von besonderem Interesse sein, da intrazellulär lebende Pathogene, wie z. B. Listerien oder Mykobakterien, über diesen Mechanismus in die Zelle gelangen, um sich innerhalb der Immunzellen zu vermehren ^{52;53}. Durch die intrazelluläre Lokalisation dieser Pathogene ist die intrazelluläre Verfügbarkeit der NOD-Liganden gewährleistet. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass MDP über den aktiven humanen Peptid-Transporter 1 (hPepT1), welcher in den Transport von Di- und Tripeptiden der Nahrung über die Plasmamembran von intestinalen Epithelzellen involviert ist, in die Zelle gelangt ⁵⁴. Uehara *et al.* hingegen gehen von einer passenden Verfügbarkeit der Agonisten aus, indem MDP bzw. ie-DAP den Zellen in geeigneten Aggregatzuständen, z. B. in Form von Wasser-in-Öl-Emulsionen, präsentiert werden. Hierbei scheint eine Diffusion der NOD1- bzw. NOD2-Agonisten in die Zelle der wahrscheinliche Mechanismus der Stimulus-Aufnahme zu sein ¹³⁸.

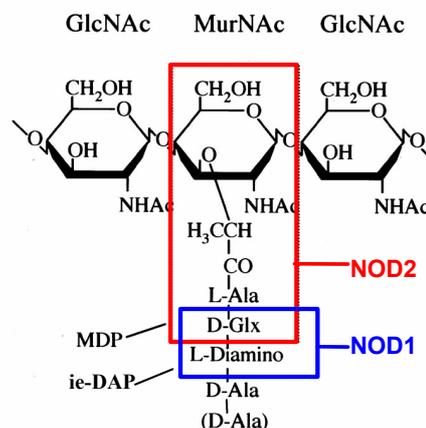


Abbildung 2: Schematische Struktur von Peptidoglycan (PG) mit den durch NOD1 und NOD2 erkannten minimalen Strukturen MDP und ie-DAP (modifiziert nach Girardin; *J. Biol. Chem.*, 2003; 8869)

Durch NLRs induzierte Signalwege

Nach Erkennung von ie-DAP bzw. MDP durch NOD1 bzw. NOD2 wird deren Selbst-Oligomerisation induziert, was wiederum die Assoziation mit *downstream*-Molekülen wie der Serin-Threonin-Kinase *receptor-interacting protein 2* RIP2 (auch RIPK2, CARDIAK und RICK genannt) über die N-terminalen CARD-Domänen vermittelt ^{1;29;32;34;35}. Diese CARD-CARD-Interaktion zwischen RIP2 und NOD1 bzw.

NOD2 induziert eine Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und Degradierung von I κ B und damit eine anschließende NF- κ B-Aktivierung (siehe Abbildung 3)^{55,56}. Dabei schreibt Chen *et al.*⁵⁷ NOD2 eine duale Funktion zu: In der Abwesenheit von RIP2 fungiert NOD2 als Suppressor der induzierten NF- κ B-Aktivierung, wohingegen NOD2 in der Gegenwart von RIP2 als intrazellulärer Sensor für MDP angesehen werden kann. Inohara *et al.*⁵⁸ hingegen berichtet von einer RIP2-Region zwischen der CARD- und der Kinase-Domäne, welche die Signalweiterleitung über eine Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit NEMO (*NF- κ B essential modulator*)/IKK (I κ B Kinase γ) vermittelt, was wiederum die NOD1- bzw. NOD2-Aktivierung mit der Phosphorylierung von I κ B- α und die dadurch bedingte Aktivierung von NF- κ B verbindet.

Wie Abbildung 3 zu entnehmen ist, können NOD1 bzw. NOD2 zusätzlich zur NF- κ B Aktivierung eine über die MAP-Kinasen induzierte pathogen-induzierte Expression und Sekretion von inflammatorischen Zytokinen vermitteln. Unter anderem konnten Girardin *et al.*⁵⁹ zeigen, dass NOD1 eine Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) nach Stimulation mit Bakterien induziert. Ein Nachweis der MDP-abhängigen Phosphorylierung durch die *extracellular signal-regulated protein kinase* (ERK) in NOD2-defizienten murinen Makrophagen lieferten Pauleau *et al.*⁶⁰. Darüber hinaus konnte von Kobayashi *et al.*⁶¹ gezeigt werden, dass RIP2 an der durch ERK-induzierten p38/SAPK Kinase-Aktivierung beteiligt ist. Der genaue Mechanismus der molekularen Interaktion der durch NOD1 bzw. NOD2 induzierten Aktivierung von JNK bzw. p38 konnte allerdings noch nicht aufgezeigt werden.

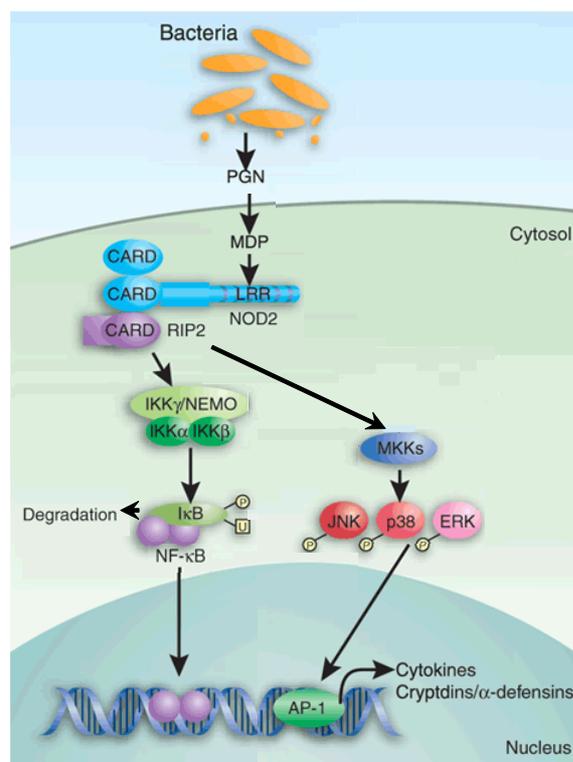


Abbildung 3: Durch NLR induzierte Stoffwechselwege (modifiziert nach Kathrine Ris; *Nature Medicine*, 2005; 383)

Verwendung von synthetischen Peptidoglykanstrukturen

Als Bestandteil der Zellmembran Gram-positiver wie auch Gram-negativer Bakterien und als partieller Auslöser der Sepsis bzw. als Schlüsselement der chronischen Darmentzündungskrankheit Morbus Crohn ist Peptidoglykan (PG) ebenso wie die Immunreaktion des Menschen auf dieses Molekül ein wichtiger Ansatzpunkt für die Entwicklung von Medikamenten gegen diese Krankheit. Um die partiellen Strukturen dieses Moleküls und die Antwort des menschlichen angeborenen Immunsystems darauf genauer untersuchen zu können, wurden für die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Versuche synthetisch hergestellte Peptidoglykanfragmente herangezogen. In der Vergangenheit konnte bereits von Inohara *et al.*⁴⁸ und Travassos *et al.*²² gezeigt werden, dass natürliche Präparationen von bakteriellen Bestandteilen, wie LPS oder PG, Kontaminationen durch anderen bakteriellen Virulenzfaktoren beinhalteten und diese letztendlich für die beobachteten Immunreaktionen verantwortlich gemacht wurden. So waren in einigen LPS-Präparationen NOD1-Liganden vorhanden, welche eine Immunreaktion auslösten, sodass die dadurch initiierte Produktion inflammatorischer Zytokine von den Forschern irrtümlich auf die stimulatorische Fähigkeit von LPS zurückgeführt wurde⁴⁵. Ähnliches hatte sich schon kurz nach der Entdeckung der TLRs ereignet, als TLR2 zuerst als Rezeptor für Lipopolysaccharid beschrieben wurde^{62;63}. Wie sich später herausstellte, war nicht LPS für die Endotoxin- bzw. bakterielle Aktivierung der Immunzellen über TLR2 verantwortlich⁶⁴, sondern die Auslöser der Zellaktivierung waren Verunreinigungen der LPS-Präparationen mit Lipopeptiden. Auch war bis 2004 TLR2 als Rezeptor für bakterielles PG beschrieben, doch konnten Travassos *et al.*²² zeigen, dass die Aktivierung der Signalkaskade über TLR2 nicht durch PG, sondern durch die in den Präparationen vorkommenden Verunreinigungen mit Lipoproteinen und Lipoteichonsäuren ausgelöst wurde.

Um zukünftig Fehlinterpretationen dieser Art vermeiden zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit synthetisch hergestellte Peptidoglykanfragmente für die Untersuchungen der Immunantworten humaner Immunzellen verwendet, bei denen eine Kontamination mit anderen bakteriellen Virulenzfaktoren wie bspw. LPS oder Lipopeptiden aufgrund der Herstellungsweise komplett ausgeschlossen werden konnte. Darüber hinaus ist die Verwendung definierter synthetischer Peptidoglykanstrukturen ein wichtiges Werkzeug, um detailliert die Struktur-Wirkungsbeziehungen von Virulenzfaktoren und deren Rezeptoren beschreiben und untersuchen zu können. Durch die Verwendung von synthetischen Peptidoglykanstrukturen können genaue Aussagen über die Anforderungen an einen NOD-Liganden getroffen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation zum Thema „*Erkennung und Aufnahme inflammatorisch aktiver synthetischer Peptidoglykanstrukturen*“ sollte der Frage nachgegangen werden, welche minimalen synthetischen Peptidoglykanstrukturen über welchen Erkennungsmechanismus des angeborenen Immunsystems identifiziert werden und über welche Transportmechanismen diese Peptidoglykanfragmente in humane Immunzellen gelangen. Die Identifizierung der vom angeborenen Immunsystem erkannten synthetischen Peptidoglykanstrukturen und die Aufdeckung der Aufnahmemechanismen können wichtige Erkenntnisse über eine mögliche Blockierung dieser Mechanismen und der

dadurch verhinderten Inflammation liefern, und somit als Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapien für Morbus Crohn und anderen Entzündungskrankheiten dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und ihre Bezugsquellen

Agarose	Serva Elektrophoresis GmbH (Heidelberg)
Ampicillin	Biomol (Hamburg)
Aqua ad injectabilia	Braun (Melsungen)
Agarose ultra pure (low melting)	Life Technologies (Spain)
Bacto-Trypton	Otto Nordwald (Hamburg)
Bacto-Agar	Otto Nordwald (Hamburg)
β -Mercaptoethanol	Fluka (Buchs, Schweiz)
Bovine serum albumine (BSA)	Sigma (Heidelberg)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Cytochalasin D	Sigma (Heidelberg)
dNTPs (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Pharmacia (Freiburg)
ddNTPs	Pharmacia (Freiburg)
5-(N-ethyl-N-isopropyl) Amilorid (EIPA)	Sigma (Heidelberg)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva (Heidelberg)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid 1 μ g/ml	GIBCO-BRL (Eggerstein)
FCS, inaktiviert bei 56°C, sterilfiltriert	Biochrom (Berlin)
Glyzerol	Serva (Heidelberg)
Hygromyzin B	Calbiochem (USA)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Monodansylcadaverin (MDC)	Sigma (Heidelberg)
para-Formaldehyd	Fluka (Buchs, Schweiz)
Penicillin-Streptomycin-Lösung (PS) 5000U	GIBCO-BRL (Eggerstein)
Thimerosal	Sigma (Heidelberg)
Tris	Serva (Heidelberg)
Tritmethylbenzol (TMB)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Triton X-100	Serva (Heidelberg)
Türkslösung	Merck (Darmstadt)
Trypanblau	Fluka (Buchs, Schweiz)
Tween 20	Merck (Darmstadt)
Salze für Puffer und Lösungen	Merck, Fluka oder Serva
Schwere Lösung	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.1.2 Puffer

Allgemeine Puffer

- 1xPBS: 0,9 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 2,7 mM KCl, 140 mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄²⁻, 8,1 mM Na₂H₂PO₄²⁻ lösen in Aqua dest.
- 1x Azid-PBS: 3 mM NaN₃, 121,5 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4
- 1xTAE: 40 mM Tris, 20 mM Acetat, 2 mM EDTA, Aqua dest. pH 8,0
- 1xTBE: 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0
- Lysispuffer: 1 M HEPES, 3 M NaCl, 0,5 M EDTA, 10 % NP-40, 1 M β-Glycerophosphat, 1 M NaVO₄, 1 M NaF, 1 M Benzamidine, 1 M pNPP, 1 M DTT, 0,1 M PMSF, Complete (1 Tablette), Aqua dest.
- Lämmli-Puffer: 62,5 mM Tris/HCl, 10 % (v/v) Glycerol, 80 mM DTT, 0,002 % (w/v) Bromphenolblau
- Transfer-Puffer: 50 ml 20x NuPage Transfer-Buffer, 100 ml Methanol, 1 ml NuPage Antioxidant, 850 ml Aqua dest.

Färbepuffer für die immunhistochemische Anwendung

- 1xTBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7,4
- Blockpuffer: 0,1 M Glycin in 1xTBS
- Permeabilisierungspuffer: 0,2 % Triton X-100 in 1xTBS
- Antikörper-Puffer: 1xTBS, 3 % (v/v) HS, 3 % BSA (w/v)

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated Cell-Sorting, FACS)

Für die Durchflusszytometrie wurde der *mouse* α-human IL-2 Rezeptor CD25-PE-Antikörper der Firma Dako A/S (Glostrup, Dänemark) in einer Konzentration von 200 ng auf 100 µl 1xPBS verwendet.

2.1.3.2 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Nachstehend sind die für die immunhistochemische Untersuchung am konfokalen Laserscanningmikroskop verwendeten Antikörper aufgelistet.

Primäre Antikörper (jeweils 1:75 verdünnt in Antikörper-Puffer)

- *rabbit* α-human NOD1: Alpha Diagnostics (San Antonio, USA)
- *rabbit* α-human NOD2: Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz)
- *rat* α-human RIP2: Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz)
- *mouse* α-human CD14: Dianova (Hamburg)
- *goat* α-human NF-κB p65: Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
- *mouse* α-human NF-κB p65: Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
- *rabbit* α-GFP: Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

Isotyp-Antikörper

- *rat* IgG2a (RIP2): CALTAG Lab. (Burlingame, USA)
- *goat* IgG (NF- κ B p65): CALTAG Lab. (Burlingame, USA)
- *mouse* IgG1 (CD14, Calnexin): Dako A/S (Glostrup, Dänemark)
- *rabbit* serum (NOD2): Dako A/S (Glostrup, Dänemark)

Fluorochrom-konjugierte Antikörper bzw. Farbstoffe**Tabelle 2:** Fluorochrom-konjugierte Antikörper bzw. Farbstoffe und deren eingesetzte Konzentrationen bei der immunhistochemischen Färbung für die konfokale Laserscanningmikroskopie

Name	Eingesetzte Konzentration (Verdünnungen)	Bezugsquelle
α -human CD14-FITC	0,1 μ g/ μ l	BD Biosciences (Pharmingen)
Choleratoxin B Alexa 647	(1:200) 10 μ g/ml	Molecular Probes (Oregon, USA)
<i>mouse</i> α -human Calnexin-FITC	(1:200) 1,25 μ g/ml	BD Biosciences (Pharmingen)
<i>Wheat germ Agglutinin</i> Alexa 633	(1:100) 10 μ g/ml	Molecular Probes (Oregon, USA)
LysoTracker Red	(1:20 fixierte Zellen; 1:10.000 lebende Zellen) 50-75 nM	Molecular Probes (Oregon, USA)
TOTO-3 iodid	(1:150) 3,3 μ M	Molecular Probes (Oregon, USA)
ER Tracker Red	1 μ M	Molecular Probes (Oregon, USA)
BOPIPY TR C ₅ Ceramide	5 μ M	Molecular Probes (Oregon, USA)

Sekundäre Antikörper (jeweils eingesetzt in der Verdünnung 1:75 in Antikörper-Puffer; 2 μ g/75 μ l)

- *goat* α -*rabbit* Alexa 546: Molecular Probes (Oregon, USA)
- *goat* α -*rabbit* Alexa 488: Molecular Probes (Oregon, USA)
- *goat* α -*rat* Alexa 546: Molecular Probes (Oregon, USA)
- *goat* α -*rat* Alexa 488: Molecular Probes (Oregon, USA)
- *goat* α -*mouse* Alexa 546: Molecular Probes (Oregon, USA)
- *goat* α -*mouse* Alexa 488: Molecular Probes (Oregon, USA)
- *donkey* α -*goat* 586: Molecular Probes (Oregon, USA)

2.1.3.3 Westernblot

Die für den Westernblot verwendeten Antikörper sind im Folgenden als primäre und sekundäre Antikörper aufgelistet.

Primäre Antikörper

- *rabbit* α -p38: Cell Signaling (Frankfurt am Main)
- *mouse* α -phospho-p38: Cell Signaling (Frankfurt am Main)
- *rabbit* α -ERK (p44/42): Cell Signaling (Frankfurt am Main)
- *rabbit* α -phospho-ERK (pp42/44) (E-10): Cell Signaling (Frankfurt am Main)
- *mouse* α -phospho-ERK (pp42/44) (E-4): Santa Cruz Biotechnology (St. Cruz, USA)
- *rabbit* α -JNK: Cell Signaling (Frankfurt am Main)
- *mouse* α -phospho-JNK (G7): Santa Cruz Biotechnology (St. Cruz, USA)
- *rabbit* α -I κ B- α : Cell Signaling (Frankfurt am Main)
- *mouse* α -phospho-I κ B- α : Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz)

Sekundäre Antikörper

- *goat α-rabbit*: Alexa Flour 680 *goat α-rabbit* IgG(h+L), Molecular Probes Eugene (Oregon, USA)
- *goat α-rabbit*: IR Dye 800 *goat α-mouse*, Molecular Probes Eugene (Oregon, USA)
- *goat α-mouse*: IR Dye 800 *goat α-mouse*, Molecular Probes Eugene (Oregon, USA)
- *goat α-mouse*: Alexa Flour 680 *goat α-rabbit* IgG(h+L), Molecular Probes Eugene (Oregon, USA)

Tabelle 3: Zusammenfassung der verwendeten primären und sekundären Antikörper für den Westernblot und deren Verdünnungen

Primärer Antikörper	Eingesetzte Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Eingesetzte Verdünnung
α-p-38	1:1000	<i>goat α-rabbit</i>	1:10000
α-phospho-p-38	1:10000	<i>goat α-mouse</i>	1:10000
α-p-ERK	1:1000	<i>goat α-rabbit</i>	1:10000
α-phospho-p-ERK (E4)	1:1000	<i>goat α-mouse</i>	1:10000
α-phospho-p-ERK (E10)	1:2000	<i>goat α-rabbit</i>	1:10000
α-JNK	1:1000	<i>goat α-rabbit</i>	1:10000
α-phospho-JNK (G7)	1:1000	<i>goat α-mouse</i>	1:10000
α-IκBα	1:1000	<i>goat α-rabbit</i>	1:10000
α-phospho- IκBα	1:1000	<i>goat α-mouse</i>	1:10000

Sonstige Antikörper

- α-human TLR2, Clon 2392: Genentech (California, USA)
- α-human CD14: bezogen von V. Horejsi, Institut of Molecular Genetic (Prag, Tschechei)

2.1.4 Stimuli

Die verwendeten Substanzen zur Stimulation diverser Zelllinien und humaner Primärzellen (MNCs, Monozyten, DCs) sind nachfolgend im Detail benannt und die Bezugsquellen angeführt.

- LPS: von *Salmonella enterica* sv. Friedenau, Isolation durch Phenol-Chloroform-Petroleum-Ether-Methode⁶⁵, Aufbewahrung der Stammlösung in 1mg/ml Aqua dest. – Prof. Dr. Helmut Brade (FZ Borstel)
- syn MDP: bezogen von Shoichi Kusomoto (Osaka, Japan)
- GMDP: Peptech (Cirencester, UK)
- Pam3CSK4: EMC microcollections GmbH (Tübingen)
- sPG: Prof. Dr. Ulrich Zähringer (FZ Borstel)
- human TNF-α (rekombinant): Prof. Dr. Daniela Männel (Regensburg)
- *E. coli* PG: PG von *E. coli* O111 B4 InvivoGen (San Diego, USA)
- Zymosan: Sigma-Aldrich (München)

2.1.5 Synthetische Peptidoglykanstrukturen

Die verwendeten synthetischen Peptidoglykanstrukturen (synPGs) sind in Abbildung 4 dargestellt. Sie wurden von Dr. Seiichi Inamura (Osaka, Japan) synthetisiert und mir für weitere Untersuchung zur Verfügung gestellt.

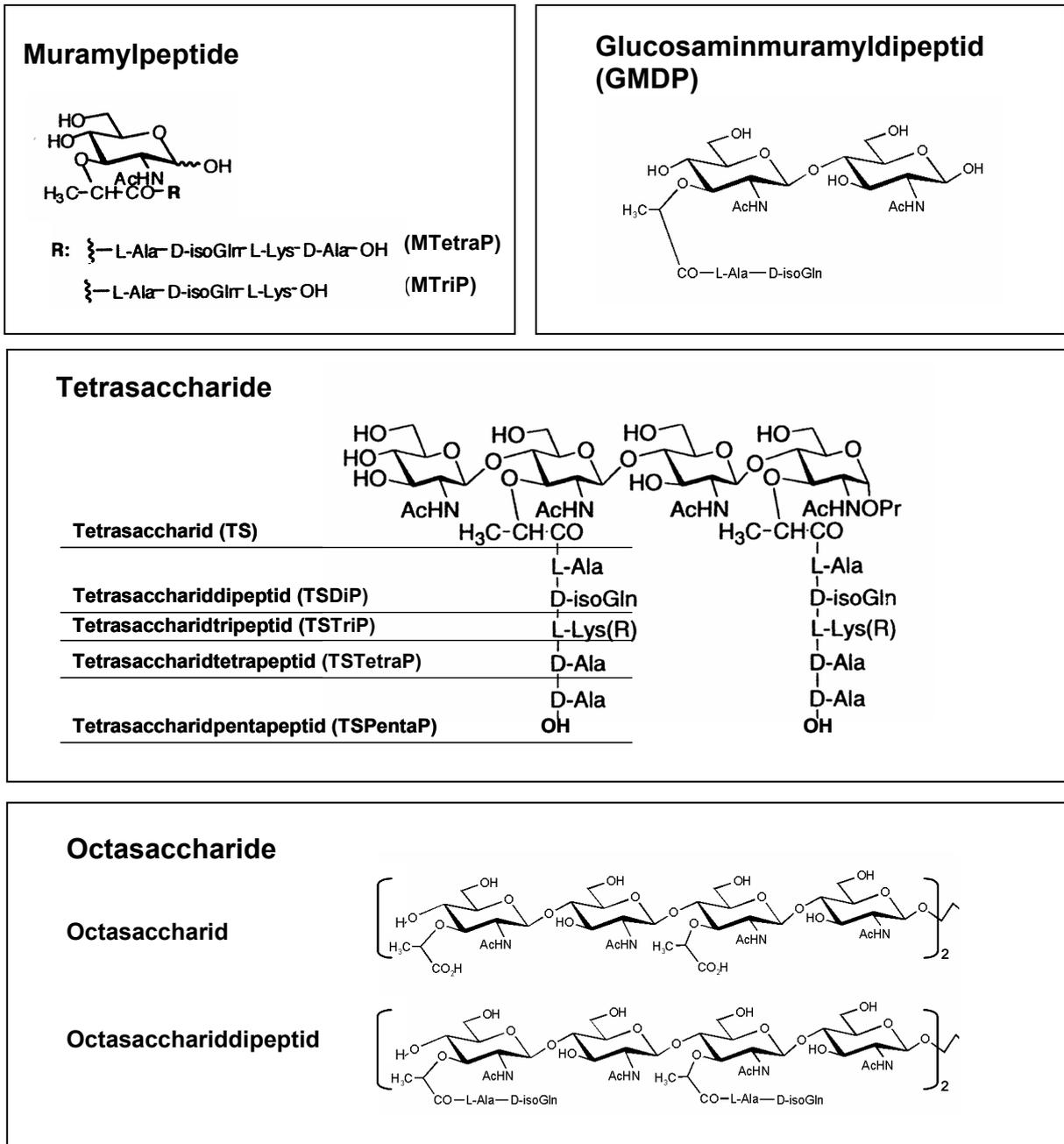


Abbildung 4: Strukturformeln der verwendeten synthetischen Peptidoglykanstrukturen und ihre Benennungen

2.1.6 Medien

Die für die Zellkultur verschiedener Zelllinien verwendeten Medien sowie die Bakterienmedien sind im Folgenden genauer beschrieben.

Bakterienmedien

- LB-Medium: 10 g Tryptone, 5 g Hefe, 10 g NaCl, lösen in 1 l Aqua dest., pH 7,0
- LB-Agar-Platten: siehe LB-Medium, zusätzlich 15 g Agar/l; Individuell wurden für die Gateway- und TOPO-Selektionen nach dem Abkühlen des noch heißen LB-Mediums auf 60°C 50 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Ampicilin oder 20 µg/ml Tetracyclin addiert.
- SOC Medium: 2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,05 % (w/v) NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glukose

Zellkulturmedien

- 1x HBSS (Hanks zum Elutrieren): 100 ml HBBS, 10 ml Natriumhydrogencarbonat (35mg/ml) ad 1 L H₂O
- RPMI komplett
(Monozyten und MNCs): RPMI 1640 Medium, Cambrex Bio Science (Verviers, Belgien), 10 % HS, 1 % PS,
- DMEM komplett (HEK293): DMEM Medium high Glucose mit L-Glutamine, PAA Laboratories GmbH (Pasching), 10 % FCS, 1 % PS
- HAMS F12 komplett (CHO): HAMS F12 mit Glutamax-I (Gibco, U.K.), 10 % FCS, 1 % PS

2.1.7 Phagozytosehemmer und Makropinozytosehemmer

Die verwendeten Phagozytosehemmer und Makropinozytosehemmer sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die eingesetzten Konzentrationen und die Bezugsquellen sind angegeben.

Tabelle 4: Phagozytose- und Makropinozytosehemmer und deren eingesetzte Konzentrationen

Substanz	Eingesetzte Konzentrationen	Bezugsquelle
Cytochalasin D (CytD)	3 µM	Sigma (Heidelberg)
Monodansylcadaverine (MDC)	100 µM	Sigma (Heidelberg)
Azid	0,1 % (v/v)	Sigma (Heidelberg)
EIPA	1 µM	Sigma (Heidelberg)
DMSO	0,3 % (v/v)	Sigma (Heidelberg)

2.1.8 Desoxyribonukleotide

In nachstehender Tabelle sind die von der Firma MWG Biotech in Ebersberg synthetisierten Desoxyribonukleotid-Primer aufgelistet.

Tabelle 5: PCR-Primer-Sequenzen, Fragmentgrößen und *Annealing*-Temperaturen

Genname	Sense primer	Antisense primer	Größe [bp]	Annealing-Temperatur [°C]
human GAPDH	5' GTC ATC ATC TCC GCC CCT TCT GC 3'	5' GAT GCC TGC TTC ACC ACC TTC TTG 3'	448	60
human β -Actin	5' AGC CGG GAA ATC GTG CGT G 3'	5' CAG GGT ACA TGG TGG TGC 3'	308	57
human β -2 M	5' GCT GTG CTC GCG CTA CTC TC 3'	5' GCG GCA TCT TCA AAC CTC CAT 3'	368	62
human NOD1	5' GCT TCT CCC CTT CCC TGC TCA CTC 3'	5' GTT CAG GCT GCC CAG GCT CTC ATT 3'	212	60
human NOD1	5' ACG CCG GCC GGG ACA CTC T 3'	5' TTT GGA CAA CAG CCC GCA CAG GA 3'	434	63
human NOD2	5' GAG CGG GGT TTC GTC AGC CAG TAT 3'	5' AGC ACA GTG TCC GCA TCG TCA TTG 3'	416	61
human NOD2	5' GAA GAA TGC CCG CAA GGT GGT GAC 3'	5' GAG GCG GCC CCG AAG AAG ACT G 3'	385	62
human PepT1	5' CAC CAT GGG AAT GTC CAA ATC ACA 3'	5' CAT GTG TTT CTG TGA ATT GG 3'	250	50
murine NOD1	5' GGG GGT GAA GGT GCT ATG TGA G 3'	5' CCT TGG CTG TGA TGC GAT TCT G 3'	505	58
murine NOD1	5' GCG CCG CGG CTG AGA CC 3'	5' GCT GCT GTG GAG GCT GGG AAG TAA 3'	555	65
murine NOD2	5' CCG CCA GCC ATT GTG AGG AGA CTC 3'	5' TGC TTC GCC CAC CAC CAG TAT G 3'	492	61
murine NOD2	5' ATG CTA TGC CGG GCT TTA TTT G 3'	5' GTG ATG TGA TTG TTC CCC ACC 3'	451	58
TOPO Primer ohne Stop-Codon human NOD1	5' CAC CAT GGA AGA GCA GGG CCA CAG 3'	5' GAA ACA GAT AAT CCG CTT CTC ATC 3'	2863	59
TOPO Primer ohne Stop-Codon human NOD2	5' CAC CAT GGG GGA AGA GGG TGG TTC 3'	5' AAG CAA GAG TCT GGT GTC CCT G 3'	3124	59

2.1.9 DNA-Polymerasen

Für die konventionelle PCR wurde der AccuPrime SuperMix I der Firma Invitrogen (Leek, Niederlande) verwendet. Dieser Ansatz beinhaltet sowohl die *Taq* DNA-Polymerase als auch die für die PCR notwendigen dNTPs und Salze. Für die Amplifizierung der CDS des NOD1- und NOD2-Proteins wurde die *proofreading* PfuUltra High-Fidelity DNA-Polymerase der Firma Stratagene (La Jolla, USA) eingesetzt. Dieses Enzym ist aufgrund seiner guten Korrekturlese-eigenschaft durch eine sehr geringe Fehlerrate bei der DNA-Replikation gekennzeichnet.

2.1.10 Plasmide

Folgende Plasmide wurden für die Klonierung und Expression von NOD1 und NOD2 verwendet. Sonstige Vektoren zur Transfektion von HEK293-Zellen sind ebenfalls angegeben.

2.1.10.1 TOPO Vektor

- pENTR/D-TOPO: Invitrogen (Leek, Niederlande)
- pENTR/D-TOPO NOD1: selbst generiert
- pENTR/D-TOPO NOD2: selbst generiert

2.1.10.2 Gateway Expressions-Vektor

- pcDNA3V40: Invitrogen (Leek, Niederlande)
- pcDNA3V40 NOD1: selbst generiert
- pcDNA3V40 NOD2: selbst generiert
- pcDNAdest47/GFP: Invitrogen (Leek, Niederlande)
- pcDNAdest47/GFP NOD1: selbst generiert
- pcDNAdest47/GFP NOD2: selbst generiert

2.1.10.3 Sonstige Vektoren

- pcDNA3huNOD1: bezogen von P. Rosenstiel, Institut für klinische Molekularbiologie, Christian Albrecht Universität (Kiel)
- pcDNA3huNOD2: bezogen P. Rosenstiel, Institut für klinische Molekularbiologie, Christian Albrecht Universität (Kiel)
- pFlag-CMV TLR2: selbst generiert
- pREP9Flag huTLR4: selbst generiert
- pCEP4 CD14: selbst generiert
- pEFBOS MD-2 Flag: selbst generiert
- pcDNA3: Invitrogen (Leek, Niederlande)

2.1.11 Bakterien

- *E. coli* TOP10 one shot: Invitrogen (Leek, Niederlande)
- *E. coli* DH5 α : Invitrogen (Leek, Niederlande)
- *E. coli* DB 3.1: Invitrogen (Leek, Niederlande)

2.1.12 Kits

- RNAeasy Kit (Mini und Midi): Qiagen (Hilden)
- EndoFree Plasmid Mega Kit: Qiagen (Hilden)
- Fast Plasmid Mini: Eppendorf (Hamburg)
- UV-Free S.N.A.P. Purification Kit: Invitrogen (Leek, Niederlande)
- EndoTrap: Profos (Regensburg)
- pENTR Directional TOPOCloning Kit: Invitrogen (Leek, Niederlande)
- GATEWAY Cloning Technology: GIBCO BRL Life Technologies
- RC DC Protein Assay: BioRad (Hercules, USA)

2.1.13 Geräte

- Electrophoresis Power Supply EPS 300: Pharmacia Biotech
- Elisa Tecan Sunrise: Tecan (Crailsheim)
- Eppendorf BioPhotometer: Eppendorf (Hamburg)

- Eppendorf Centrifuge 5415C:	Eppendorf (Hamburg)
- Eppendorf Thermomixer compact:	Eppendorf (Hamburg)
- Eppendorf Thermomixer 5436:	Eppendorf (Hamburg)
- FACS Calibur:	Becton Dickinson
- IKA Combimag:	IKA-Labortechnik (Staufen)
- Mastercycler gradient:	Eppendorf (Hamburg)
- peqLab Modell A1:	Biotechnologie GmbH (Erlangen)
- Plattenschüttler:	Edmund Bühler KM-2 (Hechingen)
- Rotanta 46RC:	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
- Speed Vac Plus SC 110A:	Savant von GMI Inc. (Ramsey, USA)
- Sysmex Platelet Counter PL-100:	Digitana (Hamburg)
- Binocular und Durchlichtmikroskop:	Zeiss (Jena)
- Konfokales Laserscanning Mikroskop:	Leica TCS SP (Bensheim)
- Fluoreszenzmikroskop:	Nikon Diaphot 300 (Düsseldorf)
- Zeiss LSM 510:	Carl Zeiss (Jena)
- PhosphorImager SI:	Molecular Dynamics (Sunnyvale, USA)
- Novex Mini-Cell:	Invitrogen (Leek, Niederlande)

2.1.14 Sonstiges

- Fluoresbrite™ plain YG 10 microspheres Latexbeads:	Polysciences (Warrington, USA)
- DNA-Marker GeneRuler 100bp DNA ladder plus:	Fermentas (St. Leon-Rot)
- DNA-Marker GenRuler 1kb DNA ladder:	Fermentas (St. Leon-Rot)
- DNA-Marker TriDye 1kb DNA ladder:	New England BioLabs (Beverly, USA)
- DNA-Marker Lambda - pUC Mix Marker:	Fermentas (St. Leon-Rot)
- Proteinmarker Plus Protein Dual Color Standard:	BioRad (Hercules, USA)
- GEArray Q Series Human Inflammatory Cytokine & Receptor Gene Array:	SuperArray Bioscience Corporation (Frederick, USA)
- Glas Bottom Dishes Collagen coated (Ø 3,5 cm):	MatTek Corporation (Ashland, USA)
- NuPage Novex high-performance 4-12 % Bis-Tris Gels:	Invitrogen (Leek, Niederlande)
- NuPage MOPS SDS Running Buffer (20x):	Invitrogen (Leek, Niederlande)
- NuPage Antioxidant:	Invitrogen (Leek, Niederlande)

2.1.15 Zellen und Zelllinien

Humane embryonale Nierenepithelzellen (HEK293)

HEK293-Zellen wurden in DMEM komplett Medium in T75-Kulturflaschen (Sarstedt – Newton, USA) bei 37°C / 5 % CO₂ kultiviert und bei ca. 80 % Konfluenz geerntet und neu kultiviert. Stabil transfizierte HEK293-Zellen wurden unter zusätzlicher Gabe von 400 µg/ml G418 unter gleichen Bedingungen in Kultur gehalten.

Chinese Hamster Ovary Cells (CHO)

CHO-Zellen der Linie K1 wurden in HAMS F12 komplett Medium unter Zugabe von 400 µg/ml G418 und 400 µg/ml Hygromycin B in T75-Kulturflaschen (Sarstedt – Newton, USA) bei 37°C / 5 % CO₂ kultiviert und bei ca. 80 % Konfluenz geerntet und neu kultiviert.

Humane mononukleäre Zellen (MNCs) und Monozyten

Die Gewinnung und Kultivierung von humanen mononukleären Zellen (MNCs) und humanen Monozyten ist unter 2.2.1.1 beschrieben.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung verschiedener Zellpopulationen aus humanem Blut

Isolierung humaner MNCs

Die Isolierung humaner MNCs erfolgte über eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Paque. Das heparinisierte Vollblut gesunder Spender (Liquemin, Hoffmann-LaRoche, 20 E/ml) wurde mit gleichen Teilen HBSS gemischt. Danach wurden 40 ml des Ansatzes auf 10 ml Biocoll Separation Solution geschichtet. Die anschließende 40-minütige Zentrifugation bei 400xg und RT wurde ohne Bremse gestoppt und der Plasmaüberstand abgesaugt. Die in der Interphase sedimentierten MNCs wurden mit einer sterilen Pasteurpipette geerntet und zweimal mit HBSS gewaschen (10 min, 400xg, 4°C). Anschließend wurde die Zellzahl unter Zuhilfenahme eines Zählgerätes bestimmt (Sysmex Platelet Counter LP-100, Digitana, Hamburg) und die gewünschte Zahl an Zellen mit RPMI komplett auf das benötigte Volumen eingestellt.

Isolierung humaner Monozyten

Mithilfe der Gegenstrom-Elutriation (JE-6B-Elutriator, Beckmann Instruments, München) wurden Monozyten aus den humanen MNCs isoliert. Dazu wurden MNCs in HBSS mit 1 % FCS in einer Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml aufgenommen und bei laufendem Rotor (3000 Upm, 12°C) und einer Fließgeschwindigkeit von 25 ml/min in die Trennkammer des Elutriatorrotors eingeschleust. Nach schrittweiser Steigerung der Fließgeschwindigkeit auf 50 ml/min wurden die Zellen in Fraktionen zu 50 ml gesammelt. Die gewünschte Monozytenfraktion wurde bei 400xg und 4°C 10 min zentrifugiert, bevor sie zur Charakterisierung der Reinheit anhand der Größenverteilung der Zellen und deren Anzahl im Channelizer (Coulter Electronics, Krefeld) analysiert wurde.

2.2.1.2 Zellstimulation

Stimulation von MNCs und Monozyten

Zur Stimulation von denen wie in Punkt 2.2.1.1 beschrieben isolierten MNCs und Monozyten wurden diese in einer Konzentration von $0,5 \times 10^5$ Zellen/100 μ l/well in einer 96er-Rundbodenplatte (Greiner bio-one, Fa. Greiner, Frickenhausen) in RPMI komplett Medium ausgesät. Die verwendeten Stimuli wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in einem Volumen von 50 μ l addiert und die 96-Well-Mikrotiterplatten für 4 h bei 37°C inkubiert. Die Verdünnung der Stimuli erfolgte in RPMI komplett Medium. Anschließend wurden die 96er-Rundbodenplatten für 5 min bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand für weitere Untersuchungen abgenommen und bei -20°C gelagert.

Stimulation von transient transfizierten HEK293

Von den einen Tag zuvor transient transfizierten HEK293-Zellen (Punkt 2.2.2.13) wurden das Medium abgenommen und durch 150 μ l Stimulus/Well einer 96er-Platte in unterschiedlichen Konzentrationen ersetzt. Die Verdünnung der Stimuli erfolgte in DMEM komplett Medium. Die stimulierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und der Überstand am nächsten Tag zur weiteren Analyse abgenommen und bei -20°C gelagert.

Stimulation von CHO-Zellen

Die CHO-Zellen der Linie 3E10hTLR2 wurden in einer Konzentration von $0,2 \times 10^6$ Zellen/500 μ l HAMS F12 komplett Medium/well in einer 24-Wellplatte (Nunclon Surface, Nunc, Roskilde – Dänemark) ausgesät und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Stimulation erfolgte durch Auswechslung des Mediums mit dem zuvor in HAMS F12 komplett Medium verdünnten Stimulus und einer folgenden Inkubation der Zellen für 18 h bei 37°C. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen für eine Immunfluoreszenzmarkierung vorbereitet (Punkt 2.2.3.2).

2.2.1.3 Phagozytose-Assay

Um zu überprüfen, inwieweit die inflammatorische Aktivität der synthetischen Peptidoglykanstrukturen phagozytoseabhängig bzw. makropinozytoseabhängig ist, wurden mit verschiedenen phagozytose- und makropinozytosehemmenden Substanzen deren Einfluss auf die inflammatorische Aktivität einzelner synPGs analysiert. Diesbezüglich wurden zum einen humane MNCs bzw Monozyten und zum anderen transient transfizierte HEK293-Zellen im Durchflusszytometer, im konfokalen Laserscanningmikroskop und die Überstände der behandelten Zellen mittels TNF- α und IL-8 ELISA untersucht.

Durchflusszytometrie

Die phagozytierenden Eigenschaften von Monozyten und HEK293-Zellen wurden mittels FITC-gekoppelter Fluoresbrite TM plain YG 10 microspheres Latexbeads der Firma Polysciences (Warrington, USA) im Durchflusszytometer bestimmt. Hierzu wurden 1×10^6 MNCs bzw. Monozyten in 500 μ l RPMI komplett Medium pro Well in einer 24-Wellplatte ausgesät (die HEK293-Zellen wurden einen Tag zuvor in einer Konzentration von $0,2 \times 10^6$ Zellen/500 μ l DMEM komplett pro Well ausgesät) und der jeweilige Phagozytoseblocker bzw. Makropinozytosehemmer in verschiedenen Konzentrationen addiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Überstände abgenommen und pro Well 10×10^6 Latexbeads in 500 μ l Medium dazugegeben und 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die

Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 1500 rpm der Überstand abgenommen. Die pelletierten Zellen wurden zweimal in 1xPBS gewaschen (5 min, 1500 rpm, 4°C) und anschließend in 150 µl Azid-PBS unter Zugabe von 150 µl 3 % PFA resuspendiert und fixiert. Bis zur weiteren Analyse am Durchflusszytometer konnten die Zellen dunkel bei 4°C bis zu 7 Tage gelagert werden.

Konfokale Laserscanningmikroskopie

Am konfokalen Laserscanningmikroskop wurden die phagozytierenden Eigenschaften von Monozyten und deren Beeinflussung von phagozytosehemmenden und makropinozytosehemmenden überprüft. Hierzu wurden erneut die FITC-gekoppelten Latexbeads verwendet. Die Monozyten wurden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml RPMI komplett Medium in Collagen-gecoateten Glas Bottom Dishes der Firma MatTek Corporation (USA) ausgesät und über Nacht bei 37°C adhären gelassen. Dann wurden die phagozytose- bzw. makropinozytosehemmenden Substanzen addiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und 10×10^6 Latexbeads in 1 ml Medium addiert und der Ansatz für 4 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen wie unter Punkt 2.2.3.7 beschrieben nach CD14 und Nukleinsäuren immunhistochemisch angefärbt. Die Detektion der gefärbten Zellen erfolgte mithilfe des Leica TCS SP Laserscanningmikroskops und der Software TCS NT. Die Auswertung der Bilder wurde mit dem Programm IrfanView und Adobe PhotoShop 5.5 durchgeführt.

TNF- α und IL-8 ELISA

Der Einfluss von phagozytosehemmenden und makropinozytosehemmenden Substanzen auf die Freisetzung von TNF- α und IL-8 wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurden die Monozyten in einer Konzentration von $0,5 \times 10^5$ Zellen/100 µl RPMI komplett Medium pro Well in einer 96-Wellplatte ausgesät (HEK293-Zellen wurden in einer Konzentration von $0,25 \times 10^5$ /150 µl DMEM komplett Medium einen Tag zuvor ausgesät) und 50 µl der dreifach konzentrierten phagozytosehemmenden bzw. makropinozytosehemmenden Substanzen addiert (zu den HEK293-Zellen wurden 150 µl der einfach konzentrierten phagozytosehemmenden bzw. makropinozytosehemmenden Substanz addiert). Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die 96-Well-Mikrotiterplatten bei 1500 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand durch den entsprechenden in Medium gelösten Stimulus ersetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 4 h wurden die Zellen erneut 5 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Untersuchung der freigesetzten Zytokine mittels ELISA bei -20°C gelagert.

2.2.1.4 Kinetik am konfokalen Laserscanningmikroskop

Die Untersuchung von transient transfizierten HEK293-Zellen mit pcDNA-Dest47 NOD2 über einen bestimmten Zeitraum wurden zur Analyse der Lokalisation des NOD2-GFP Proteins in der Zelle durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Intensität des GFP-Signals in der Zelle nach Stimulation beobachtet. Hierzu wurden die HEK293-Zellen wie unter Punkt 2.2.2.13 beschrieben transfiziert. Die Stimulation erfolgte unmittelbar vor Beginn der konfokalen Laserscanninganalysen am Mikroskop im Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Schütze.

2.2.1.5 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (Braun, Ludwigshafen). Dazu wurden die geernteten und in 5 ml Medium resuspendierten Zellen mit einer Trypanblau-Lösung 1:20 vermischt und anschließend die lebenden Zellen gezählt und die Gesamtlebendzellzahl berechnet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA aus verschiedenen Zelllinien und primären humanen Blutzellen wurde mithilfe der RNeasy Mini-Säulen der Firma Qiagen isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.2.2 cDNA-Synthese

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurden 11 µl der RNA mit 1 µl eines Oligo dT₁₂₋₁₈-Mixes (1Oligo dT₁₂₋₁₈ von Invitrogen, Leek, Niederlande) und 1 µl eines dNTP-Mixes (dNTP-Set 100 mM Eppendorf, Hamburg) versetzt und 5 min bei 65°C inkubiert. Nach anschließender 5-minütigen Abkühlung auf Eis wurden 7 µl eines Mastermixes bestehend aus 4 µl 5xSuperScript III-Puffer (Invitrogen Leek, Niederlande), 1 µl RNase Out Ribonuklease Inhibitor (Invitrogen, Leek, Niederlande), 1 µl reverse Transkriptase SuperScript III (Invitrogen, Leek, Niederlande) und 1 µl DTT (Invitrogen, Leek, Niederlande) addiert. Der gesamte Ansatz wurde für 60 min bei 50°C inkubiert, danach wurde die Temperatur für 15 min auf 70°C erhöht. Die fertig synthetisierte cDNA konnte bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert werden.

2.2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zum Nachweis verschiedener Gene wird das Verfahren der Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Hierbei wird das zu untersuchende Gen unter Zuhilfenahme von bestimmten sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primern) unter Einbeziehung einer thermostabilen DNA-Polymerase in bestimmten Temperaturzyklen vervielfacht.

Nachweis verschiedener Gene in verschiedenen Zelltypen

Die PCR zum Nachweis von NOD-Genen als auch von diversen *Houskeeping*-Genen wurde mit dem AccuPrime SuperMix I von Invitrogen (Leek, Niederlande) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine vorgefertigte Mixtur aus *Taq* DNA-Polymerase und dNTPs. Für einen 25 µl PCR-Ansatz wurden 12,5 µl des AccuPrime SuperMix I, 9,5 µl H₂O, jeweils 0,5 µl des 100 µM forward Primers und des reverse Primers sowie 2 µl der zu untersuchenden cDNA zusammengegeben. Die PCR wurde im Mastercycler gradient von Eppendorf (Hamburg) durchgeführt. Die PCR-Bedingungen, wie *Annealing*-Temperaturen und Elongationszeiten, wurden den entsprechenden Primern und den zu amplifizierenden Gensequenzen angepasst. Die *Annealing*-Temperaturen der einzelnen Primer sind in Tabelle 5 aufgeführt. Eine Übersicht der allgemeinen PCR-Bedingungen ist in Tabelle 6 dargestellt. Die PCR-Produkte konnten bis zur weiteren Untersuchung bei 4°C gelagert werden.

Tabelle 6: PCR-Bedingungen für die Amplifikation von Gensequenzen mit dem AccuPrime SuperMix I

Schritt	Zyklusphase	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	Initiale Denaturierung	94	120
2	Denaturierung	94	30
3	Hybridisierung/ <i>Annealing</i>	-	30
4	Elongation	68	30
5	Wiederholung der Schritte 2-4 30x	-	-
6	Finale Elongation	68	30

Gradienten-PCR

Um die optimale *Annealing*-Temperatur einzelner Primer zu bestimmen, konnte ein Temperaturgradient von beliebiger Größe in den PCR-Cycler einprogrammiert werden, sodass die *Annealing*-Temperaturen in den einzelnen Ansätzen variierten. Die Unterschiede der *Annealing*-Temperaturen richteten sich nach dem einprogrammierten Gradienten.

Amplifikation von humaner NOD2 CDS

Die Amplifikation der humanen NOD2 CDS wurde mithilfe der *proofreading* PfuUltra High-Fidelity DANN-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Diese Polymerase zeichnet sich durch eine sehr geringe Fehlerrate der DNA-Replikation aus, was zur Erhaltung eines funktionalen Proteins unerlässlich ist. Darüber hinaus bildet die PfuUltra-Polymerase keine für die Klonierung in den TOPO-Expressionsvektor störenden 3'-Poly-A-Enden, wie es beispielsweise bei der Taq-Polymerase häufiger vorkommt. Um eine möglichst hohe Ausbeute an amplifizierter NOD2 CDS zu erhalten, wurde die PCR in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Ansätze ist in Tabelle 7 dargestellt sowie das verwendete PCR-Programm in Tabelle 8. Die PCR-Produkte konnten bis zur weiteren Untersuchung bei 4°C gelagert werden.

Tabelle 7: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes zur Amplifikation der NOD2 CDS mittels der PfuUltra DNA-Polymerase

PCR-Reagenz	Volumen [µl]
Wasser, steril	40
10x PfuUltra-Puffer	5
dNTPs (10 mM each)	1
Template pcDNA3NOD2 (100ng/µl)	1
Primer forward (100ng/µl)	1
Primer reverse(100ng/µl)	1
PfuUltra-Polymerase (2,5 U)	1

Tabelle 8: PCR-Bedingungen für die Amplifikation der NOD2 CDS mit der DNA-Polymerase PfuUltra

Schritt	Zyklusphase	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	Initiale Denaturierung	95	120
2	Denaturierung	95	60
3	Hybridisierung/Annealing	59	60
4	Elongation	72	210
5	Wiederholung der Schritte 2-4 29x	-	-
6	Finale Elongation	72	600

Kolonie-PCR

Um transformierte Bakterien ohne vorherige Plasmidpräparation (Punkt 2.2.2.9) auf ihre Plasmidzusammensetzung hin untersuchen zu können, macht man sich das Prinzip der Kolonie-PCR zunutze. Dabei werden anstelle der cDNA einer normalen PCR (Punkt 2.2.2.3) Bakterien einer einzelnen Kolonie als Template/Vorlage für die Amplifikation verwendet. Hierzu wird mit einer sterilen 10 µl Pipettenspitze eine einzelne Kolonie gepickt und die an der Spitze haftenden Bakterien direkt im PCR Ansatz resuspendiert. Die Bakterien werden im PCR Cycler durch die hohen Temperaturen der ersten PCR-Schritte denaturiert, und die Primer können an das Plasmid hybridisieren.

2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA-Molekülen anhand ihrer Ladung und Größe in einer Agarose-Matrix. Die positiv geladenen DNA-Moleküle wandern zum positiven Pol, wobei kleinere Moleküle aufgrund des geringeren Widerstandes des Agarosegels schneller wandern als große.

Die Agarose wurde in Konzentrationen von 0,8-1 % (w/v) in 1xTBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und anschließend durch vorsichtiges Rühren auf ca. 60°C abgekühlt. 5 µl der EthBr-Lösung (1 µg/ml) wurden auf 100 ml flüssige Agarose gegeben und anschließend das Gel gegossen. Nach Auftragung der Proben (10 µl Probe + 2 µl schwere Lösung) wurde die Elektrophorese durch Anlegen einer Spannung von 80-120 Volt in 1xTBE gestartet. Die Dokumentation des Gels erfolgte bei UV-Licht (320 nm) und wurde mittels des ChemiDoc-Geldokumentationssystems und der Quantity One 4.1.1-Software analysiert.

2.2.2.5 DNA-Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten diente der genaueren Analyse von Plasmiden oder PCR-Produkten und wurde mit diversen Restriktionsenzymen durchgeführt. Eine Liste der verwendeten Enzyme und deren eingesetzte Konzentrationen sowie deren optimale Wirkungstemperatur sind in Tabelle 9 aufgeführt.

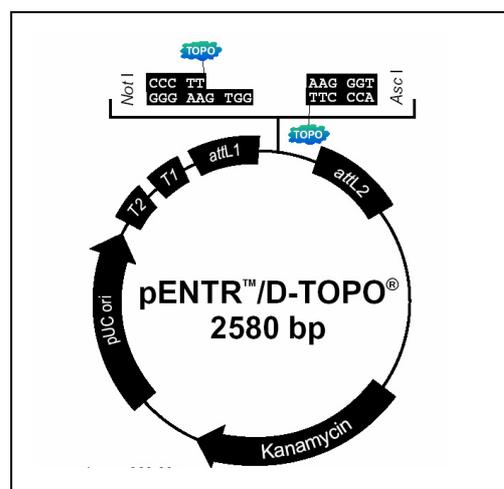
Tabelle 9: Verwendete Restriktionsenzyme und deren Inkubationszeiten sowie -temperaturen

Enzymname	Bezugsquelle	Inkubations-temperatur [°C]	Inkubationsdauer [min]
BsrGI	New England Biolabs	37°C + BSA	90
SacII	New England Biolabs	37°C	90
XmnII	New England Biolabs	37°C + BSA	90
HindIII	New England Biolabs	37°C	90

Für einen typischen 20 µl Restriktionsverdau wurden 0,5 µg DNA, 2 µl des entsprechenden mitgelieferten 10xPuffers, 5 Units/µg DNA-Restriktionsenzym und gegebenenfalls 1 % einer 100xBSA-Lösung eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei den der Tabelle 9 zu entnehmenden Temperaturen und in den genannten Zeiten. Anschließend wurden die verdauten DNA-Fragmente in einer Agarose-Gel-elektrophorese aufgetrennt und analysiert.

2.2.2.6 TOPO Cloning Kit

Zur Klonierung der humanen NOD1 und NOD2 CDS wurde das pENTR Directional TOPO Cloning Kit (Invitrogen, Leek, Niederlande) verwendet. Als *Entry-Vektor* wurde der pENTR/D-TOPO-Vektor benutzt, um anschließend die NOD1 bzw. NOD2 CDS in einen *Gateway Expression-Vektor* überführen zu können. Um die gewünschte Gensequenz in den *Entry-Vektor* klonieren zu können, muss diese mithilfe spezieller Primer so modifiziert werden, dass am 5'-Ende des zu klonierenden Fragmentes ein Überhang aus vier Basen der Sequenz CACC vorhanden ist. Dieser Überhang ermöglicht die Klonierung des gewünschten Fragments in der richtigen Richtung des *Entry-Vektors*. Die TOPO Cloning Site sowie die Vektorkarte sind in Abbildung 5 und 6 dargestellt.

**Abbildung 5:** Vektorkarte des pENTR/D-TOPO-Vektors; Quelle: Invitrogen (Leek, Niederlande)

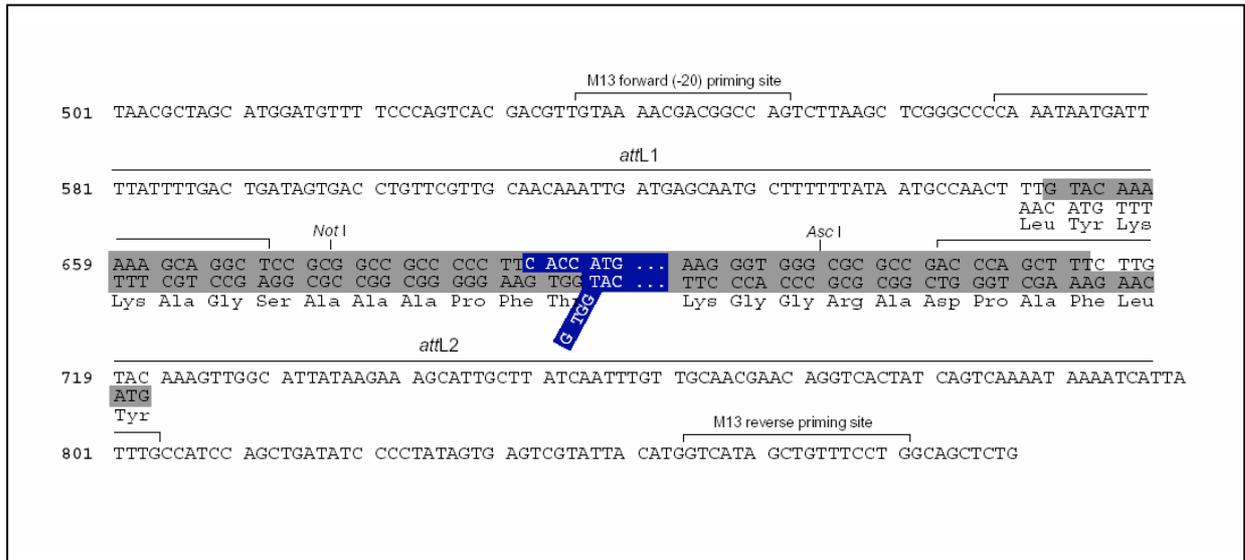


Abbildung 6: TOPO Cloning Site des pENTR/D-TOPO-Vektors; Quelle: Invitrogen (Leek, Niederlande)

Die gewünschte TOPO-Klonierungsreaktion wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die durch die TOPO-Reaktion gewonnenen pENTR/D-TOPO NOD1- und pENTR/D-TOPO NOD2-Plasmide sind in Abbildung 7 gezeigt.

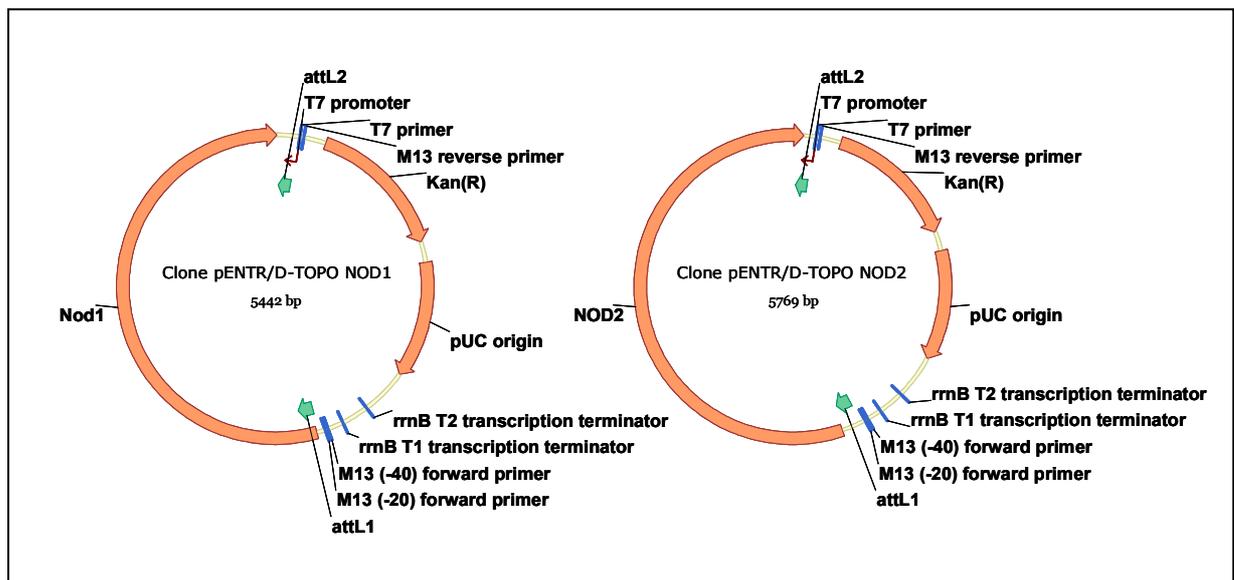


Abbildung 7: Vektorkarten der Plasmide pENTR/D-TOPO NOD1 und pENTR/D-TOPO NOD2

Um den korrekten Einbau der gewünschten Sequenz in den *Entry-Vektor* überprüfen zu können, wurden die Plasmide nach Arbeitsanweisung des Herstellers in chemisch kompetente One Shot TOP10 *E. coli* transformiert (Punkt 2.2.2.8) und diese über Nacht hochgezogen. Nachdem anschließend Plasmidpräparationen (Punkt 2.2.2.9) mehrerer Kolonien durchgeführt wurden, konnten die Plasmide durch Restriktionsverdau verschiedener Enzyme und anschließender Auftrennung der Fragmente

mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert werden (Punkt 2.2.2.4). Ausgewählte und infrage kommende Plasmide wurden zur genaueren Analyse sequenziert (Punkt 2.2.2.12).

2.2.2.7 Gateway Technology

Die Gateway Technology macht sich die schnelle und effiziente Fähigkeiten des Bakteriophagen Lambda zunutze, seitenspezifische Rekombination zu betreiben. Dadurch können spezifische Gene, welche sich in einem *Entry-Vektor* befinden und von speziellen Sequenzen flankiert werden (den attL1 und attL2 sites im Entry-Vektor und den attB1 und attB2 sites im Expression-Vektor), einfach und effizient in einen Gateway *Expression-Vektor* umkloniert werden. Dies geschieht über eine so genannte LR-Reaktion, in der über die attL1 und attL2 sites des *Entry-Vektors* und die attB1 und attB2 sites des *Expression-Vektors* mithilfe eines LR-Clonase-Enzym-Mixes das Gen transferiert wird.

Die LR-Reaktion wurde laut Herstellerangaben durchgeführt und die anschließend chemisch transformierten Bakterien mithilfe von Restriktionsanalysen untersucht. Ausgewählte und infrage kommende positive Plasmide wurden anschließend sequenziert. Die verwendeten *Expression-Vektoren* sind in Abbildung 8 dargestellt. Die fusionierten *Expressions-Vektoren* sind in Abbildung 9 gezeigt.

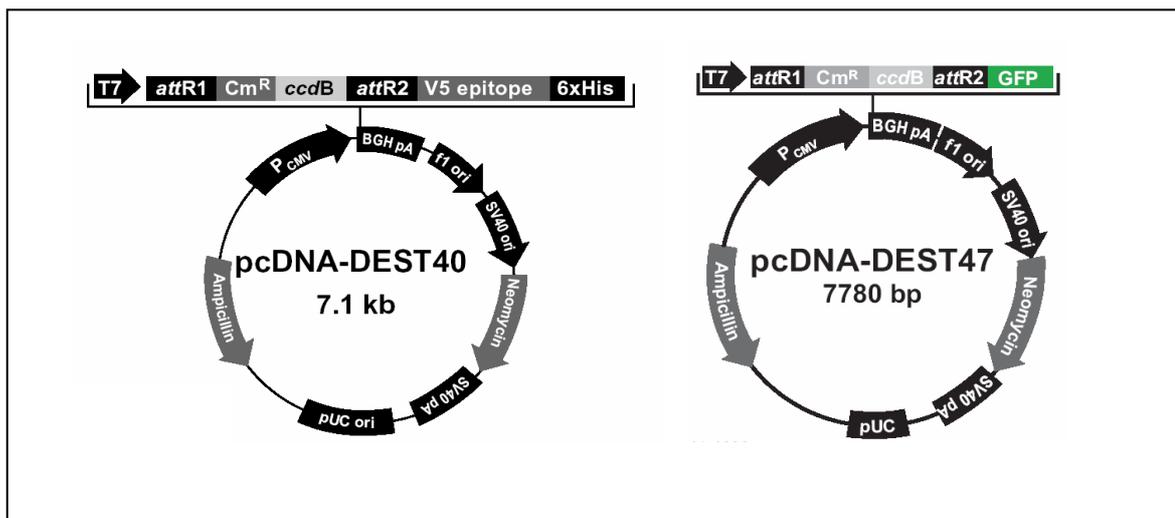


Abbildung 8: Vektorkarten der Plasmide pcDNA-Dest40 und pcDNA-Dest47; Quelle: Invitrogen (Leek, Niederlande)

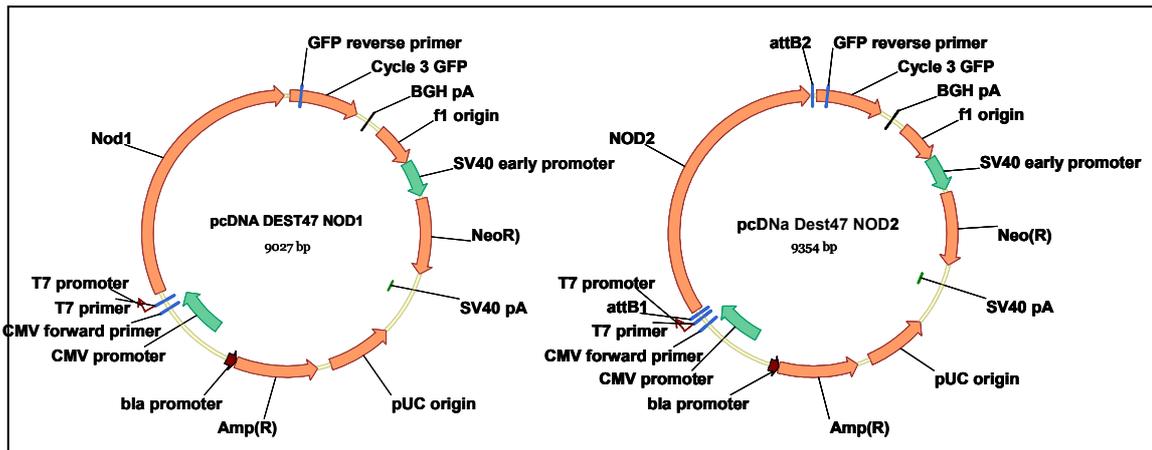


Abbildung 9: Vektorkarten der Plasmide pcDNA-Dest47 NOD1 und pcDNA-Dest47 NOD2

2.2.2.8 Transformation

Die Transformation von Bakterien beinhaltet das Einbringen von Fremd-DNA (Plasmide/Vektoren) in ein Bakterium. Ziel ist es, die Fremd-DNA mithilfe der Bakterien zu vervielfachen, um sie hinterher genauer analysieren zu können.

Die Transformation von Fremd-DNA in chemisch kompetenten One Shot TOP10 *E. coli*-Zellen erfolgte über verschiedene Temperaturschritte. Für jeden Transformationsansatz wurden 50 µl der One Shot TOP10 *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, zu denen dann 1 µl der Fremd-DNA addiert wurde. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, anschließend exakt für 30 sec auf 42°C erhitzt und dann erneut auf 0°C abgekühlt. Nach Zugabe von 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium wurden die Reaktionsgefäße bei 37°C für genau eine Stunde bei 225 rpm inkubiert. Danach wurden 10 und 100 µl des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit Ampicillin oder Kanamycin, abhängig vom verwendeten Plasmid, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Kolonien mittels Kolonie-PCR (Punkt 2.2.2.3), Plasmidpräparation (Punkt 2.2.2.9), Restriktionsverdau (Punkt 2.2.2.5) und Sequenzierung (Punkt 2.2.2.12) analysiert.

2.2.2.9 Isolierung von DNA aus Bakterienkulturen (Mini- und MidiPrep)

Um die nach der Transformation erhaltenen Plasmide aus den Bakterien zu isolieren, wurde bei einem Bakterienkulturvolumen von max. 5 ml eine MiniPrep und bei einem Bakterienkulturvolumen von max. 200 ml eine MidiPrep durchgeführt. Dabei wurden die Zellen lysiert und die Plasmid-DNA mittels Bindung und Eluierung an und von einer Säulenmatrix isoliert. Für eine MiniPrep wurde das Fast Plasmid Mini Kit von Eppendorf (Hamburg) verwendet, für eine Präparation eines größeren Bakterienkulturvolumens wurde das EndoFree Plasmid Mega Kit von Qiagen (Hilden) benutzt. Die Isolation erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.2.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Ermittlung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte bei einer Extinktion von 260 nm an dem Spektralphotometer Eppendorf BioPhotometer.

2.2.2.11 Aufreinigung und Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Um die mittels der TOPO-Primer generierten spezifischen PCR-Produkte der humanen NOD1 bzw. NOD2 CDS in den pENTR/D-TOPO klonieren zu können, müssen diese zuvor von den übrigen Oligonucleotiden (Primern) separiert werden. Dies erfolgt über die Aufreinigung des PCR-Fragmentes mithilfe des S.N.A.P. UV-Free Purification Kit von Invitrogen. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.2.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide wurde von der Firma MWG Biotech AG in Ebersberg durchgeführt. Hierzu wurden 2 µg/µl Plasmid-DNA mit der Vakuum-Zentrifuge Speed Vac Plus SC 110A (von Savant) lyophilisiert und anschließend an die o.g. Firma geschickt.

2.2.2.13 Transfektion von HEK293-Zellen

Die Transfektion von Fremd-DNA in HEK293-Zellen erfolgt unter der Zuhilfenahme verschiedener Transfektionsreagenzien.

Polyfect

Bei Verwendung des Transfektionsreagenzes Polyfect von Qiagen wurden zuvor $2,5 \times 10^5$ HEK293-Zellen/150 µl DMEM komplett pro Well in einer 96er-Platte über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden pro Well 200 ng des zu transfizierenden Plasmids mit 30 µl DMEM-Medium pur und 1 µl Polyfect 10 sec gevortext und dann 10 min bei RT stehen gelassen. Danach folgte die Zugabe von 120 µl DMEM komplett und der anschließende Ersatz des Mediums durch den 150 µl umfassenden Polyfectansatz. Für weitere Untersuchungen wurden die Zellen erneut 24 h lang bei 37°C inkubiert.

Nanofectin

Das Transfektionsreagenz Nanofectin wurde zur Untersuchung von transfizierten HEK293-Zellen am konfokalen Laserscanningmikroskop verwendet. Dazu wurden $0,3 \times 10^6$ HEK293-Zellen/1 ml DMEM komplett/Glas Bottom Dishes (MatTek Corporation, USA) ausgesät und 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µg des zu transfizierenden Plasmids mit 333 µl DMEM pur und 6,6 µl Nanofectin 10 sec gevortext und dann 10 min bei RT stehen gelassen. Nach Addition von 800 µl DMEM komplett wurde das Medium in den Glas Bottom Dishes durch den Nanofectinansatz ersetzt und die Zellen erneut für 24 h bei 37°C inkubiert.

2.2.2.14 cDNA-Microarray-Analysen

Um die Regulation von verschiedenen Zytokinen und deren Rezeptoren in humanen Monozyten nach Stimulation mit den Substanzen TSDiP und Pam3CSK4 auf Genebene analysieren zu können, wurden

cDNA-Microarray-Analysen durchgeführt. Dazu wurden aus drei verschiedenen Spendern die RNA isoliert, gepoolt (jeweils in gleichen Teilen 0,2 bis 1,0 µg RNA/ Spender und Ansatz) und für die cDNA-Microarray-Analysen nach Durchführung einer PCR mittels des AmpoLabelling Kits (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, USA) und unter Verwendung von P³³-markierten dCTP-Nukleotiden (Hartmann-Analytik) eingesetzt. Die Hybridisierung der cDNA auf die Zytokine & Receptor Gene cDNA Microarrays erfolgte nach Herstellerangaben der Firma SuperArray Bioscience Corporation (Frederick, USA).

Direkt im Vorwege der Hybridisierung der PCR-Amplikons auf die Arraymembranen wurde die DNA 2 min bei 95°C denaturiert. Nach 18 h Hybridisierung bei 60°C wurden die Membranen mehrfach gewaschen, in Szintillationsfolien (PerkinElmer; Wellesley, USA) blasenfrei eingeschweißt und für 120 h bei Raumtemperatur auf Phosphorimage-Belichtungsplatten (Molecular Dynamics; Sunnyvale, USA) aufgelegt. Das Einlesen der belichteten Platten erfolgte mithilfe eines Phosphorimager SI (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) und der Image Quant Software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA). Die abschließende mathematische Kalkulation der Rohdaten (Grideinteilung, Hintergrundsubtraktion, Datennormalisierung) wurde mithilfe der Phoretix Array v3.11 Software von Nonlinear Dynamics (Newcastle upon Tyne, GB) durchgeführt.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Zytokinbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration verschiedener Zytokine wurden ELISAs verschiedener Firmen verwendet. In Tabelle 10 sind die eingesetzten und verwendeten ELISAs aufgeführt. Die Durchführung wurde nach Herstellerangaben praktiziert. Die Absorptionsmessung der entwickelten ELISAs erfolgte bei einer Wellenlänge von 550 nm am Elisa Tecan Sunrise Reader der Firma Tecan (Crailsheim). Zur Auswertung wurde die Software Magellan 2 verwendet.

Tabelle10: Übersicht der verwendeten ELISAs und deren Bezugsquellen

Zytokin	Bezugsquelle des ELISA
human TNF-α	Intex AG
human IL-1β	R/D-Systems
human IL-5	eBioscience
human IL-6	eBioscience
human IL-8	Biosource
human MDC	R/D-Systems
murin TNF-α	Biosource
murin IL-6	Biosource

2.2.3.2 Immunfluoreszenzmarkierung für die FACS (*Fluorescence-activated Cell-Sorting*)-Analyse

Die CHO-Zellen der Linie 3E10hTLR2 exprimieren humanes TLR2 sowie humanes CD14. Die Zelllinie wurde so transformiert, dass nach Stimulation der CHO-Zellen über einen der oben aufgeführten

Rezeptoren NF- κ B translokiert wird und dadurch das humane Molekül CD25 als Teil des humanen IL-2-Rezeptors auf der Oberfläche expremiert wird. Dieses Molekül kann dann über die Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Hierzu wurden die wie in Punkt 2.2.1.2 beschrieben stimulierten CHO-Zellen mit 500 μ l T/E-Lösung für 5 min bei 37°C aus den Wells gelöst und nach anschließender Überführung in ein FACS-Röhrchen 5 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden 3 μ l des α -humanCD25-PE-gekoppelten Antikörpers in 100 μ l 1xPBS addiert und der Gesamtansatz gemischt. Danach folgte eine Inkubation im Dunkeln bei 4°C für 20 min. Nach Addition von 300 μ l 1xPBS und anschließender Vermischung wurden die Zellen für 5 min bei 1500 rpm und 4°C pelletiert und danach in 200 μ l 1xPBS unter Zugabe von 200 μ l 3 % PFA addiert und fixiert. Bis zur weiteren Untersuchung am Durchflusszytometer konnten die Ansätze bei 4°C bis zu 7 Tage dunkel gelagert werden.

2.2.3.3 Präparation von Zelllysaten für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nach der Stimulation und Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, 4°C) der Zellen wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 150 μ l Lysepuffer lysiert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem RC DC Protein Assay der Firma BioRad (Hercules, USA). Die Messung der Proteinkonzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 700 nm im Tecan Reader vorgenommen. Die Lysate wurden anschließend 1:2 mit Lämmli-Puffer verdünnt und für 5 min bei 95°C reduziert.

2.2.3.4 SDS-PAGE

Gleiche Mengen der zu untersuchenden Proteinlysate sowie ein Standard Proteinmarker (Plus Protein Dual Color Standard, BioRad, Hercules, USA) wurden in die Taschen der NuPage Novex high-performance 4-12 % Bis-Tris-Gels der Firma Invitrogen (Leek, Niederlande) aufgetragen. Der Lauf erfolgte in NuPage MOPS SDS Running Buffer der Firma Invitrogen (Leek, Niederlande) unter reduzierenden Bedingungen (NuPage-Antioxidant, Invitrogen, Leek, Niederlande) für 1 h bei 200 Volt in der Novex Mini-Cell (Invitrogen, Leek, Niederlande).

2.2.3.5 Westernblot auf PVDF-Membran und immunhistochemische Färbung

Die in der SDS-PAGE nach Ladung und Größe aufgetrennten Proteine wurden nun mittels eines Westernblots auf eine PVDF-Membran geblottet, um diese immunhistochemisch nachzuweisen. Das Blotten wurde in der Novex Mini-Cell (Invitrogen, Leek, Niederlande) nach Herstellerangaben in Transfer Puffer (50 ml 20x NuPage-Transfer-Buffer, 100 ml Methanol, 1 ml NuPage-Antioxidant, 850 ml Aqua dest.) für 1-2 h bei 30 Volt durchgeführt.

2.2.3.6 Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen auf einer Nitrocellulose-Membran

Um die über den Westernblot auf die PVDF-Membran übertragenen Proteine nachweisen zu können, wurden die unter Punkt 2.1.3.3 in Tabelle 3 aufgeführten Primärantikörper und deren Verdünnungen

sowie die aufgelisteten Sekundärantikörper verwendet. Die Nitrocellulose-Membran wurde nach kurzem Waschen der Membran in 1xPBS 1 h zum Blocken der unspezifischen Bindungsstellen in Blockpuffer der Firma Odyssey Li-Cor (Lincoln, USA) bei RT inkubiert, bevor der Primärantikörper bei 4°C über Nacht zur Inkubation addiert wurde. Nach mehrmaligem Waschen der Membran in T/PBS (0,1 % (v/v) Tween in PBS-Lösung) wurde am nächsten Tag für 1 h bei RT und im Dunkeln der Sekundärantikörper zu der Membran gegeben. Erneut wurde die Membran mehrmals in T/PBS gewaschen, bevor die Sekundärantikörper durch Anregung mit Licht der Wellenlängen 700 nm und 800 nm im Blot-Scanner Odyssey Li-Cor detektiert werden konnten. Die Auswertung der Blots erfolgte mit der Software Odyssey v1.2.

2.2.3.7 Immunhistochemische Färbung von fixierten Zellen für die konfokale Laserscanningmikroskopie

Der Nachweis von Proteinen in fixierten Zellen erfolgte über immunhistochemische Färbungen. Organellen und Nukleinsäuren wurden mithilfe direktmarkierender Farbstoffe/Fluorochrome gefärbt. Zum Nachweis von Proteinen und Organellen wurden Monozyten in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml RPMI komplett Medium in Collagen-gecoateten Glas Bottom Dishes der Firma MatTek Corporation (USA) ausgesät. Zur immunhistochemischen Färbung von HEK293-Zellen wurde diese wie unter Punkt 2.2.2.13 beschrieben zuvor transient transfiziert. Der allgemeine immunhistochemische Nachweis der Proteine und Organellen erfolgte nach dem in Abbildung 10 gezeigten Schema. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie deren Verdünnungen sind unter Punkt 2.1.3.2 sowie in Tabelle 2 aufgeführt. Die Analyse der immunhistologisch gefärbten Zellen erfolgte am konfokalen Laserscanningmikroskop TCS SP der Firma Leica unter Zuhilfenahme der Software TCS NT. Die Auswertung der Bilder wurde mit dem Programm IrfanView und Adobe PhotoShop 5.5 durchgeführt.

2.2.4 Statistische Auswertung

Soweit nicht anders angegeben ist, wurden die Versuche dreimal durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Student t-Tests.

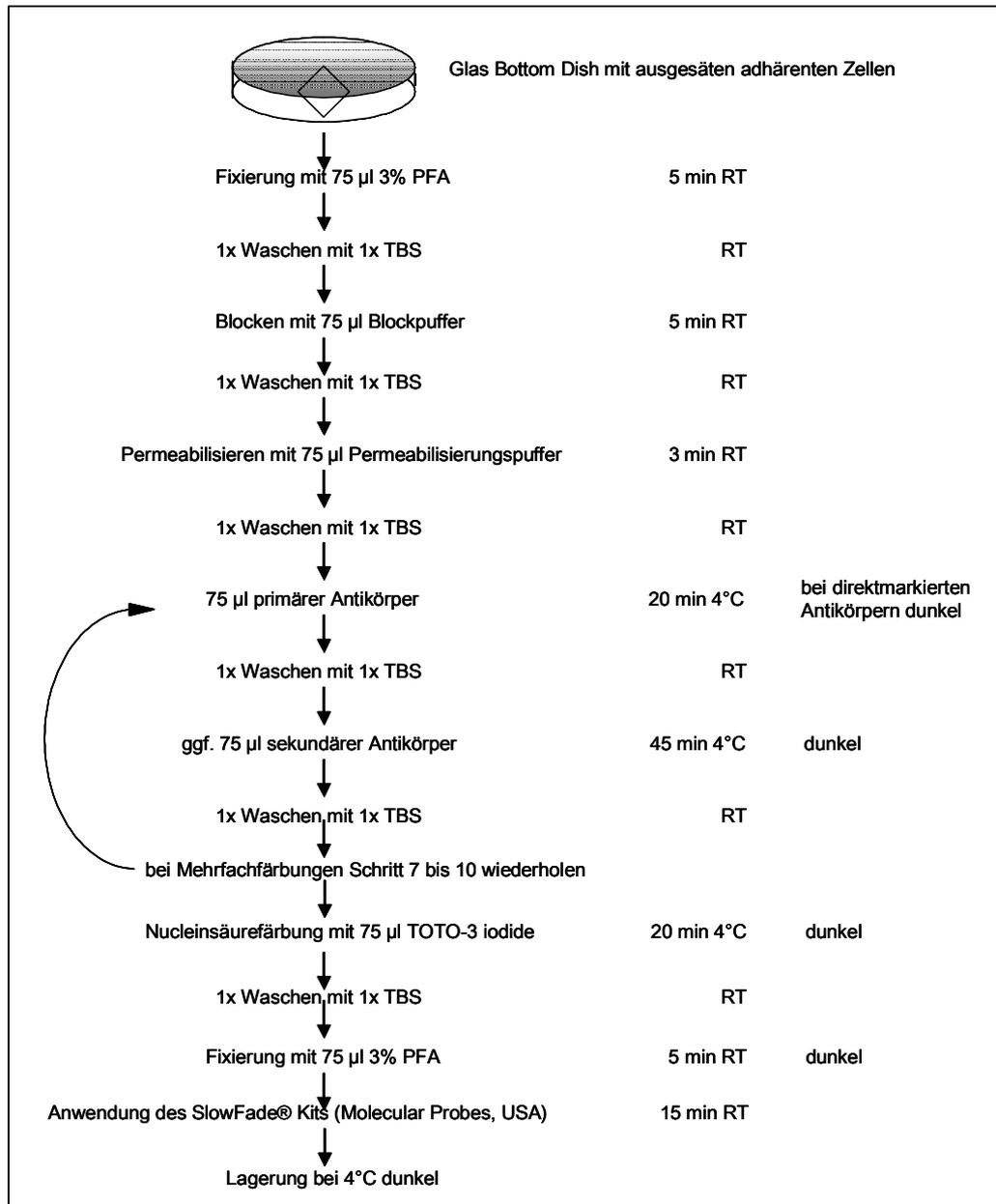


Abbildung 10: Schema der immunhistochemischen Nachweismethode von Proteinen und die Färbung von Organellen

3 Ergebnisse

3.1 Inflammatorische Aktivität synthetischer Peptidoglykanstrukturen

Um die inflammatorische Aktivität verschiedener synthetischer Peptidoglykanstrukturen (Abbildung 4) auf humane Immunzellen zu untersuchen, wurden die von humanen mononukleären Zellen (MNCs) und humanen Monozyten nach der Stimulation mit synthetischen Peptidoglykanstrukturen freigesetzten Mengen des humanen Tumornekrosefaktor α (TNF- α) im ELISA (*Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay*) gemessen. Eine Verunreinigung der synthetischen Peptidoglykanstrukturen durch Lipopolysaccharide (LPS) konnte im Vorwege mithilfe eines *Limulus amoebocyte lysate* (LAL)-Tests ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.1 TNF- α -Freisetzung humaner mononukleärer Zellen (MNCs) und Monozyten

Zur Bestimmung der TNF- α -Konzentrationen wurden humane MNCs und Monozyten mit ansteigenden Konzentrationen (1, 10, 100, und 1000 ng/ml) von MDP, MTriP, MTetraP, TS, TSDiP, TSTriP, TSTetraP, TSPentaP, OS und OSDiP für 4 h bei 37°C stimuliert und der Überstand anschließend im ELISA untersucht. Verschiedene Konzentrationen einer Lipopolysaccharid-Präparation von *S.friedenau* (LPS), Peptidoglykan aus *Saphylococcus aureus* und 10 und 100 nM Pam3CSK4 dienten als Positivkontrollen sowie steriles DMEM komplett Medium als Negativkontrolle. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 und 12 dargestellt.

Es konnte deutlich gezeigt werden, dass synthetische Peptidoglykanstrukturen mit Peptidketten, die aus mehr als drei Aminosäuren bestehen, keine Freisetzung von TNF- α in humanen MNCs sowie Monozyten induzierten, wohingegen synthetischen Peptidoglykanstrukturen mit Peptidketten aus mindestens zwei Aminosäuren und maximal drei Aminosäuren die Immunzellen zur Freisetzung des inflammatorischen Zytokins anregen. Die Anzahl der Saccharideinheiten in den synthetischen Peptidoglykanstrukturen spielen dabei keine Rolle. So können Monosaccharide (Muramyldi- und -tripeptid [MDP, MTriP]), Tetrasaccharide (Tetrasacchariddi-, -tri-, -tetra- und -pentapeptid [TSDiP, TSTriP, TSTetraP, TSPentaP]) und das Octasacchariddipeptid (OSDiP) humane MNCs und Monozyten zur Freisetzung des Zytokins TNF- α anregen. Darüber hinaus ist eine Mindestkonzentration der synthetischen Peptidoglykanstrukturen von 100 ng/ml bei MNCs erforderlich, um eine Freisetzung von TNF- α im ELISA detektieren zu können. Bei der Stimulation humaner Monozyten reicht eine Konzentration der synthetischen Peptidoglykanstrukturen von 10 ng/ml aus, um eine Freisetzung von TNF- α zu induzieren. Bei einer Konzentration von 100 ng/ml synPG kann die maximale TNF- α -Freisetzung beobachtet werden. Eine Menge von 1000 ng/ml führt bei humanen Monozyten bereits zu einer im Vergleich zu 100 ng/ml reduzierten TNF- α -Ausschüttung.

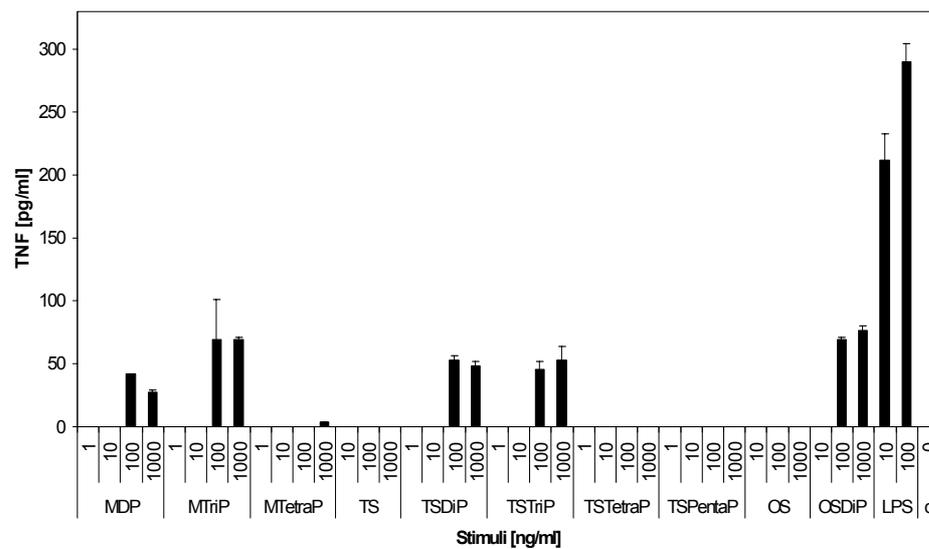


Abbildung 11: Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 4 h stimulierter MNCs mittels ELISA

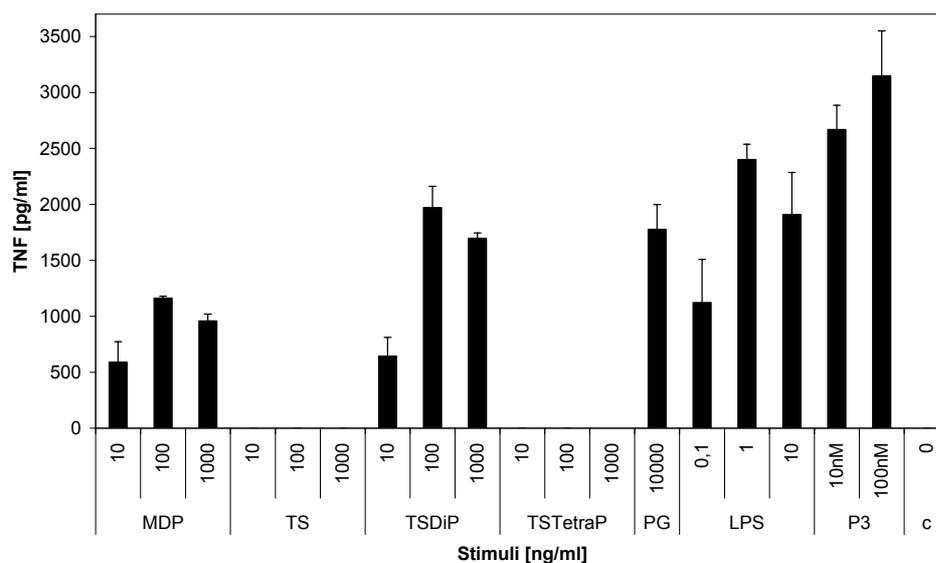


Abbildung 12: Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 4 h stimulierter Monozyten mittels ELISA

3.2 Untersuchungen des Einflusses inhibitorischer Antikörpern

3.2.1 TLR2-Abhängigkeit

Von Aliprantis *et al.*⁶⁶, Schwandner *et al.*⁶⁷ und Lien *et al.*⁶⁸ konnte gezeigt werden, dass PG-Präparationen und Lipopeptide wie Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid 2kDa (Malp2) und Pam3CSK4 von dem angeborenen Immunsystem durch den Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2) erkannt werden und z. B. bei humanen MNCs und Monozyten eine TNF- α -Freisetzung induzieren. Hier sollte analysiert werden, ob durch einen antagonistischen TLR2 Antikörper die Freisetzung des Zytokins TNF- α in mit synthetischen Peptidoglykanstrukturen stimulierten MNCs blockiert werden kann. Dafür

wurden die Monozyten für 30 Min mit 10 µg/ml antagonistischen α-TLR2 Antikörper inkubiert und anschließend für 4 h mit 1000 ng/ml synthetischen Peptidoglykanstrukturen (MDP, MTriP, MTetraP, TSDiP, TSTriP, TSTetraP, TSPentaP) stimuliert. Als Positivkontrolle eines mittels des antagonistischen α-TLR2 Antikörper blockierbaren TLR2-Stimulus wurden die Zellen mit 1000 und 10000 ng/ml einer Präparation von PG stimuliert. Die Ergebnisse des TNF-α-ELISA sind in Abbildung 13 aufgeführt.

Neben einer allgemeinen, aber nicht signifikanten Reduktion der TNF-α-Freisetzung durch die Vorinkubation der MNCs mit dem antagonistischen α-TLR2-Antikörper kann keine Beeinflussung der Induktion von TNF-α in den mit den synthetischen Peptidoglykanstrukturen stimulierten MNCs beobachtet werden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die durch synthetische Peptidoglykanstrukturen induzierte TNF-α-Freisetzung über TLR2 induziert wird. Lediglich die erwartete komplette Blockierung der TNF-α-Freisetzung nach der Stimulation mit der PG-Präparation ist detektierbar, da die Lipopeptide in den PG-Präparationen über TLR2 erkannt werden.

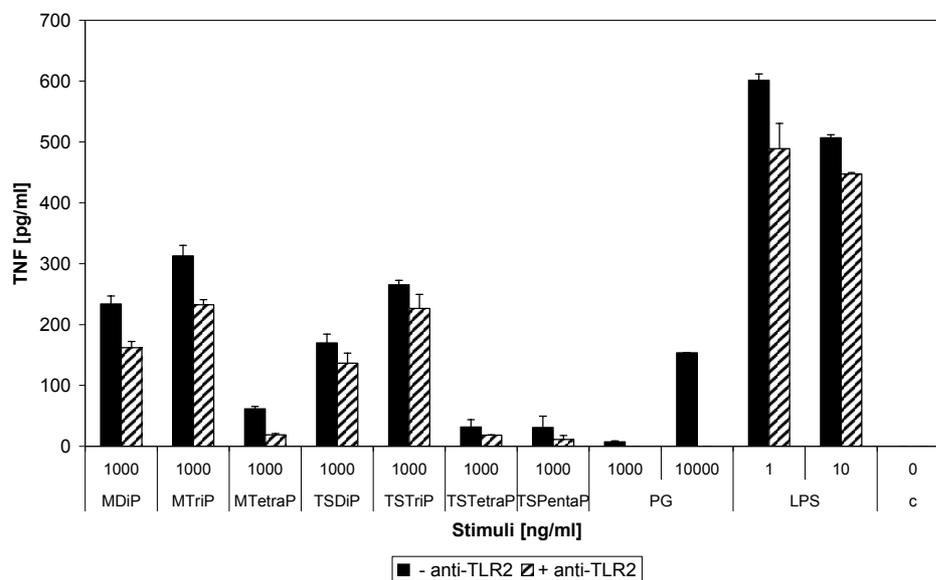


Abbildung 13: Bestimmung der TNF-α-Konzentration in Überständen 4 h stimulierter und für 30 min mit 10 µg/ml α-TLR2 Antikörper vorinkubierter humaner Monozyten

3.2.2 CD14-Abhängigkeit

In verschiedenen Versuchen wurde von Triantafidou *et al.*⁸ und Manukyan *et al.*⁶⁹ nachgewiesen, dass CD14 als Rezeptormolekül bei der Erkennung von LPS über TLR4 und Pam3CSK4 über TLR2 eine wichtige Rolle spielt. Der Einfluss von CD14 auf die Erkennung von spezifischen Liganden über intrazelluläre Toll-like-Rezeptoren, wie TLR3, TLR7/8 und TLR9, konnte bis heute nicht gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob das Rezeptormolekül CD14 eventuell einen Einfluss auf die Erkennung von synthetischen Peptidoglykanstrukturen hat, wurden humanen Monozyten vor der Stimulation mit aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen für 30 min mit 10 µg/ml anti-CD14 Antikörper vorinkubiert und anschließend für 4 h bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen OSDiP und TSDiP (1000,

3000, 10000 ng/ml) sowie Peptidoglykan (PG) (1000, 3000, 10000 ng/ml) und Lipopolysaccharid (LPS) (1, 10 ng/ml) inkubiert. In Abbildung 14 sind die Ergebnisse des TNF- α ELISAs dargestellt.

Deutlich zu erkennen ist, dass der anti-CD14 Antikörper einen starken negativen Einfluss auf die Erkennung von LPS aufweist, indem die Freisetzung von TNF- α nach der Vorinkubation mit dem anti-CD14 Antikörper und anschließender Stimulation mit LPS nahezu vollständig blockiert wird. Ähnliches ist nach der Stimulation mit PG zu beobachten. Der anti-CD14 Antikörper scheint die TNF- α -Freisetzung zu reduzieren. Dagegen ist nach der Stimulation mit OSDiP und TSDiP keine signifikante Reduktion der TNF- α -Freisetzung zu beobachten, was eine CD14-unabhängige Erkennung von synthetischen Peptidoglykanstrukturen impliziert.

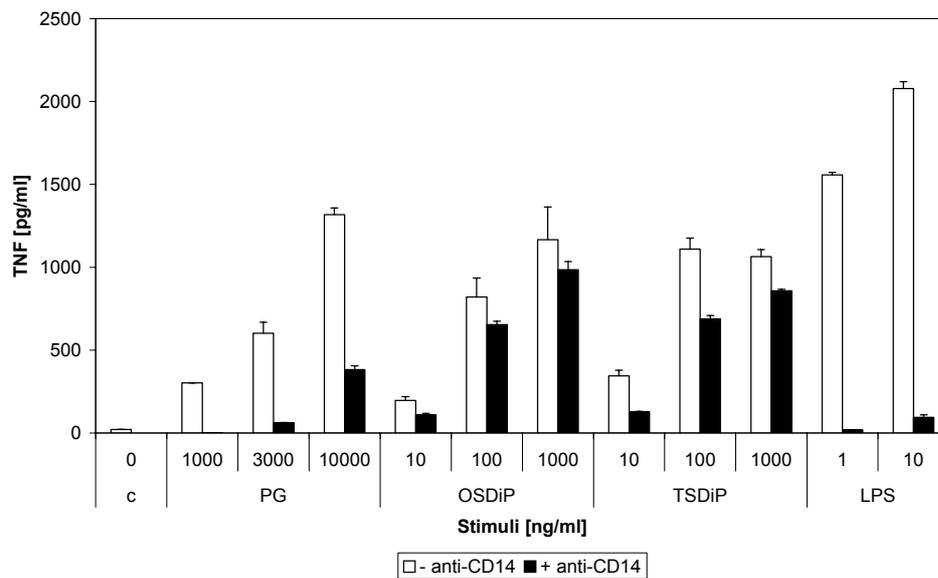


Abbildung 14: Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 4 h stimulierter und für 30 min mit 10 μ g/ml α -CD14 Antikörper vorinkubierter humaner Monozyten

3.3 TLR2-Abhängigkeit in *chinese hamster ovary* (CHO)-Zellen

Um zu verifizieren, dass synthetische Peptidoglykanstrukturen nicht über TLR2 erkannt werden, wurden mit humanem TLR2 stabil transfizierte CHO-Zellen mit 10000 ng/ml synthetischen Peptidoglykanstrukturen (MDP, MTriP, MTetraP, TSDiP, TSTriP, TSTetraP, TSPentaP) stimuliert. Diese Zelllinie exprimiert nach der Stimulation über humanes TLR2 das Molekül CD25 auf der Zelloberfläche. Dieses Molekül kann anschließend mittels PE-markierter Antikörper gegen CD25 im Durchflusszytometer detektiert werden. Als Positivkontrolle wurden die CHO-TLR2-Zellen mit den TLR2-Agonisten PG (1000 und 10000 ng/ml) und PAM3CSK4 (100 nM) stimuliert. Als Negativkontrolle dienten Medium inkubierte CHO-TLR2-Zellen.

Wie in Abbildung 15 ersichtlich, ist in den CHO-TLR2-Zellen nach der Stimulation mit synthetischen Peptidoglykanstrukturen keine induzierte Expression des Moleküls CD25 auf der Zelloberfläche zu beobachten. Einzig nach Stimulation mit den TLR2-Agonisten PG und PAM3CSK4 kann eine Expression des Moleküls CD25 auf der Zelloberfläche detektiert werden. Dies unterstützt das Ergebnis aus

Abbildung 13, in dem keine Beteiligung von TLR2 an der Erkennung von biologisch aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen nachgewiesen werden konnte.

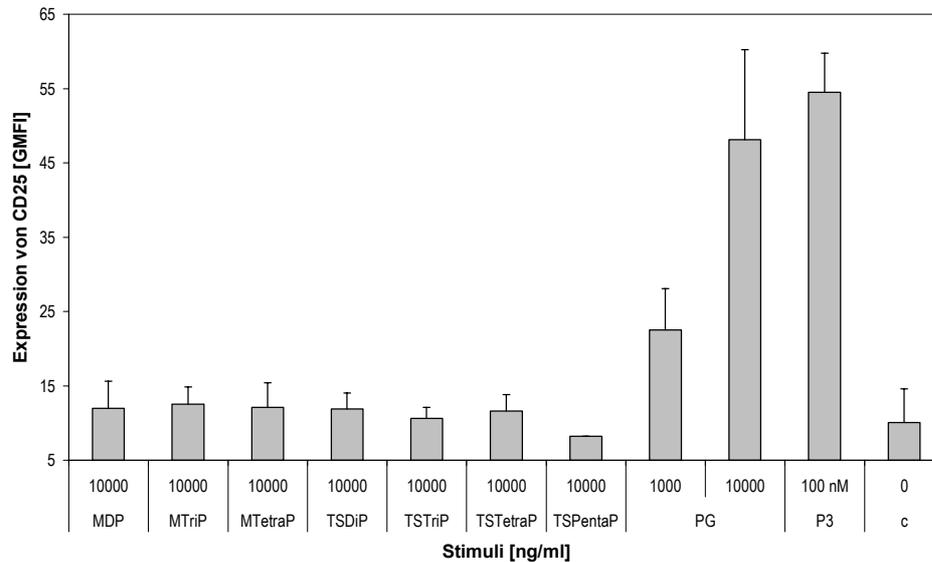


Abbildung 15: Detektion der TLR2-Aktivierung in 18 h stimulierten CHO-TLR2-Zellen anhand der CD25-Expression im FACS-Calibur. Die Expression von CD25 auf der Zelloberfläche ist angegeben als Geo Mean Fluorescence Intensity [GMFI]

3.4 Stimulation von TLR-transfizierten HEK293-Zellen

Nachdem in Versuch 13 und 15 gezeigt werden konnte, dass synthetische Peptidoglykanstrukturen nicht über humanes TLR2 erkannt werden, sollte mithilfe transient transfizierter HEK293-Zellen überprüft werden, inwieweit TLR1, TLR3, TLR5, TLR6, TLR7/8 und TLR9 in der Erkennung der synthetischen Peptidoglykanstrukturen involviert sind. Hierzu wurden die HEK293-Zellen mit den jeweiligen TLR-Gen-tragenden Plasmiden (je 200 ng/2,5 x 10⁵ HEK293-Zellen) sowie den Plasmiden mit den Genen für die erforderlichen Adaptormoleküle (je 25 ng/2,5 x 10⁵ HEK293-Zellen) transient transfiziert und anschließend mit synthetischen Peptidoglykanstrukturen (MTriP, MTetraP, TS, TSDiP, TSTriP, TSTetraP, TSPentaP, OS; OSDiP, GMDP, MDP) stimuliert. Als Positivkontrolle wurden die HEK293-Zellen mit den für den jeweiligen TLR spezifischen Agonisten stimuliert. Der TLR2-Agonist war PG (1000, 5000, 10000 ng/ml) bzw. Pam3CSK4 (10 und 100 nM), bei TLR4 wurde mit 1, 10 und 100 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert. Die Überstände der Zellen wurden nach 18 h im IL-8-ELISA analysiert.

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der TLR2/CD14 und TLR2/MD2/CD14 transfizierten HEK293-Zellen dargestellt. CD14 und MD2 sind Adaptorproteine, welche bei der Erkennung von TLR4- bzw. TLR2-Agonisten von Bedeutung sind, indem sie die Erkennung des stimulatorischen Moleküls durch eine Komplexbildung mit TLR2 oder TLR4 ermöglichen.

Es kann deutlich gezeigt werden, dass keine der synthetischen Peptidoglykanstrukturen über die Erkennung durch TLR2/CD14 und TLR4/MD2/CD14 eine Freisetzung des Zytokins IL-8 induziert. Ebenso konnte eine Beteiligung von TLR1, TLR3, TLR5, TLR6, TLR7/8 und TLR9 an der Freisetzung von IL-8 nach Stimulation mit synthetischen Peptidoglykanstrukturen ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Die Funktionalität der durch die transfizierten Plasmide exprimierten TLRs konnte durch

die Freisetzung von IL-8 nach Stimulation mit PG bzw. PAM3CSK4 als Agonisten für TLR2/CD14 und nach Stimulation mit LPS als Agonisten für TLR4/MD2/CD14 nachgewiesen werden.

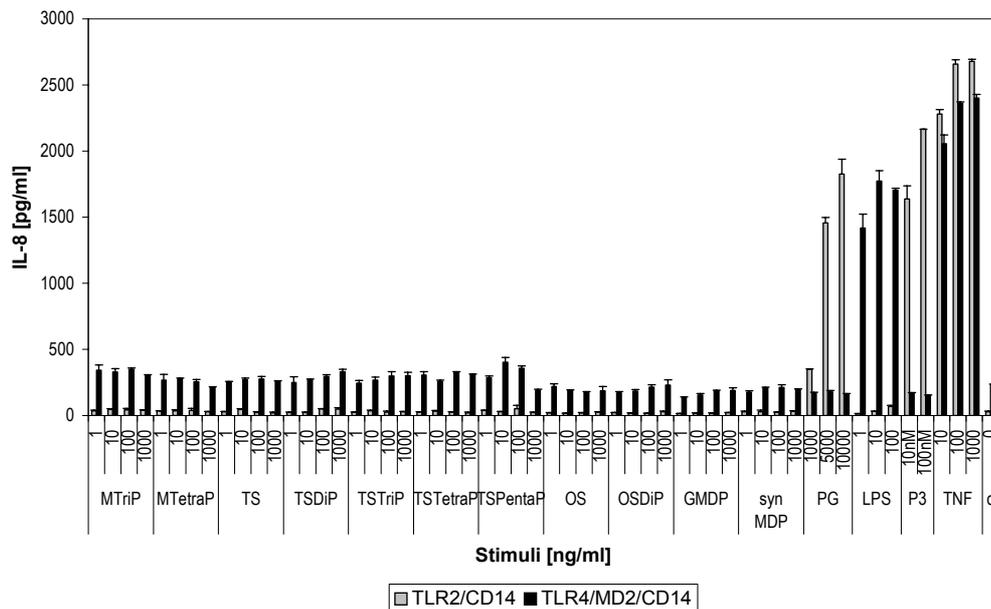


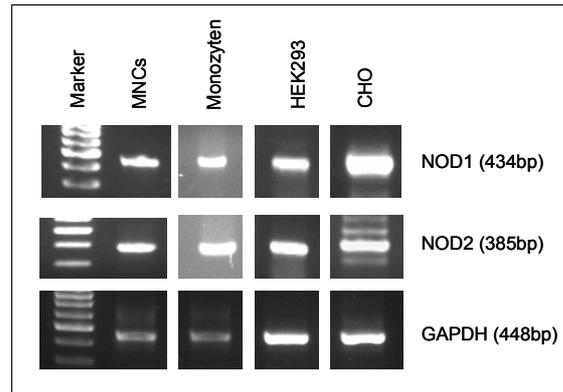
Abbildung 16: Bestimmung der IL-8 Konzentration in Überständen 18 h stimulierter transient transfizierter HEK293-Zellen mittels ELISA

3.5 Nachweis von NOD1 und NOD2 mRNA

In Punkt 3.4 konnte nachgewiesen werden, dass synthetische Peptidoglykanstrukturen nicht über TLR1-9 erkannt werden und somit nicht für die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine, wie TNF- α in MNCs oder Monozyten und IL-8 in transfizierten HEK293-Zellen, verantwortlich sein können. Zeitgleich zu diesen Ergebnissen lieferten Girardin *et al.*⁵¹ Beweise, dass ein intrazelluläres Protein der NOD-Proteinfamilie, NOD2, an der Erkennung der Struktur Muramyldipeptid (MDP) beteiligt ist. Chammaillard *et al.*⁴⁹ konnte parallel zeigen, dass NOD1 Präparationen von gamma-D-glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure (iE-DAP) erkennt. Somit konzentrierte sich die Suche nach dem Rezeptor für die synthetischen Peptidoglykanstrukturen auf die intrazellulären NOD1- und NOD2-Proteine.

Um zu analysieren, ob MNCs, Monozyten, HEK293-Zellen und CHO-Zellen NOD1 und NOD2 exprimieren, wurde die aus diesen Zellen isolierte mRNA für molekularbiologische Untersuchungsmethoden verwendet. Hierzu wurde die mRNA mittels einer RT-PCR zu cDNA umgeschrieben und diese anschließend mithilfe einer konventionellen PCR auf das Vorhandensein von NOD1 und NOD2-cDNA hin analysiert. Die PCR-Produkte wurden in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch anschließende UV-Bestrahlung detektiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

Abbildung 17: 0,8 %iges Agarosegel der mittels PCR vervielfältigten NOD1- und NOD2-cDNA verschiedener Zelltypen und -linien. Die PCR-Bedingungen sowie die Sequenzen der verwendeten Primer sind unter 2.2.2.3 in Tabelle 6 und unter Punkt 2.1.8 in Tabelle 5 aufgelistet.



Es ist deutlich zu erkennen, dass in allen untersuchten Zelltypen, wie humane MNCs und Monozyten, und in sämtlichen analysierten Zelllinien, wie HEK293-Zellen und CHO-Zellen, NOD1- und NOD2-cDNA nachweisbar ist. Dadurch stellte sich die Frage, warum einige Zelllinien trotz des Vorhandenseins NOD1-bzw. NOD2-spezifischer Gensequenzen nicht auf die Stimulation mit Myramyldipeptid (MDP) bzw. synthetischen Peptidoglykanstrukturen mit der Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen reagieren. Um diese Frage zu beantworten, wurden Plasmide mit *coding sequences* (CDS) für NOD1 bzw. NOD2 generiert, um nach anschließenden Funktionalitätsstudien im Transfektionsmodell eine Aussage über die Erkennung von synthetischen Peptidoglykanstrukturen über NOD1 bzw. NOD2 treffen zu können.

3.6 Generierung von NOD1 und NOD2 Expressionsvektoren

Zur Beantwortung der Frage, ob synthetische Peptidoglykanstrukturen tatsächlich von NOD1- bzw. NOD2-Proteinen erkannt werden, sollte das Modell der transfizierten HEK293-Zellen verwendet werden. Hierzu mussten zuerst die erforderlichen Gensequenzen, welche für das humane NOD1- bzw. NOD2-Protein kodieren, in ein geeignetes Plasmid überführt werden.

Um die kodierenden Sequenzen (CDS) der NOD1- und NOD2-Gene mithilfe des pENTR Directional TOPO Cloning Kit in den pENTR/D-TOPO-Vektor überführen zu können, mussten die erforderlichen CDS der NOD1- und NOD2-Proteine mithilfe der proofreading PfuUltra High-Fidelity DNA-Polymerase aus den Plasmiden pcDNA3NOD1 und pcDNA3NOD2 amplifiziert und anschließend zur Trennung von den Primern unter Zuhilfenahme des UV-Free SNAP Purification Kit aus dem Gel isoliert werden. Die Agarosegele sind in Abbildung 18 dargestellt. Die weißen Banden der amplifizierten (A) sowie aufgereinigten (B) NOD1- und NOD2-CDS sind deutlich auf der Höhe der 3000 bp Markerbande zu erkennen. Das Kontrollinsert liegt in beiden Agarosegelen klar auf Höhe der 750 bp Markerbande.

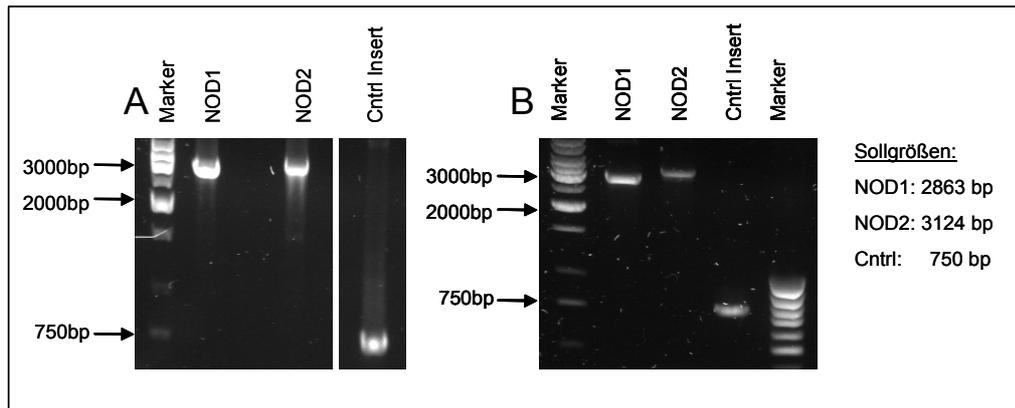


Abbildung 18: Die PCR-Bedingungen sowie die Sequenzen der verwendeten Primer sind unter 2.2.2.3 in Tabelle 7 und 8 sowie unter Punkt 2.1.8 in Tabelle 5 aufgelistet. A) Agarosegelelektrophorese (1 %iges Gel) der mit TOPO-Primern generierten NOD1- und NOD2-CDS PCR-Fragmente. B) Agarosegelelektrophorese (1 %iges Gel) der mittels des SNAP UV-free Purification Kits aufgereinigten PCR-Fragmente

Die aufgereinigten PCR Fragmente der NOD1- und NOD2-CDS wurden mithilfe des pENTR Directional TOPO Cloning Kit in den pENTR/D-TOPO-Vektor überführt und die so entstandenen Plasmide anhand von Restriktionsanalysen auf deren Basenzusammensetzung hin untersucht. Hierzu wurden die generierten pENTR/D-TOPO-NOD1- und pENTR/D-TOPO-NOD2-Plasmide mit den Enzymen BsrGI und SacII verdaut und die dadurch erhaltenen DNA-Fragmente in einer Agarosegelelektrophorese analysiert. Die erwarteten Bandengrößen in Basenpaaren (bp) und die Agarosegele sind in Abbildung 19 aufgezeigt. Das Plasmid pENTR/D-TOPO-NOD1 zeigt nach dem Verdau mit BsrGI das erwartete Bandenmuster von 2928 bp und 2514 bp und die erwarteten Banden in Höhe von 3597 bp und 1845 bp nach der Restriktion mit SacII. Der Vektor pENTR/D-TOPO-NOD2 weist nach der Restriktion mit BsrGI ein Bandenmuster von 3189 bp und 2514 bp auf. Die erwarteten Banden nach dem Verdau mit SacII in Höhe von 3030 bp und 2679 bp sind ebenfalls deutlich zu erkennen. In beiden Plasmiden konnte durch das korrekte Bandenmuster der ordnungsgemäße Einbau der NOD1- bzw. NOD2-CDS in den pENTR/D-TOPO-Vektor nachgewiesen werden. Diese Vektoren konnten somit für weitere Klonierungsschritte verwendet werden.

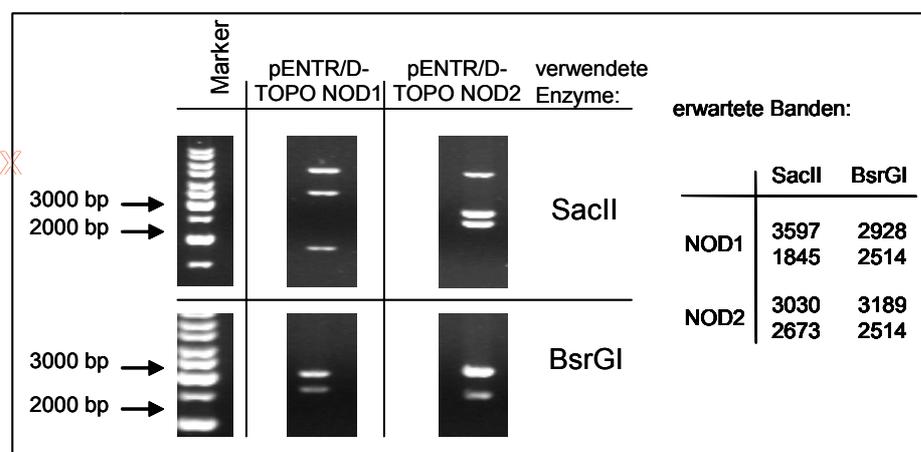


Abbildung 19: Agarosegelelektrophorese (1 %ige Gele) der mit den Enzymen BsrGI und SacII für 90 min bei 37°C geschnittenen Plasmide pENTR/D-TOPO-NOD1 und pENTR/D-TOPO-NOD2

Um die NOD1- bzw. NOD2-CDS, welche bereits erfolgreich in den pENTR/D-TOPO-Vektor kloniert wurden, in einen Expressionsvektor umzuklonieren, wurde eine Gateway-LR-Reaktion durchgeführt. Die dabei entstandenen Expressionsvektoren pcDNAdest40-NOD1 und -NOD2 sowie pcDNAdest47-NOD1 und -NOD2 wurden erneut mithilfe von Restriktionsanalysen auf die richtige Basenzusammensetzung hin überprüft. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden anschließend in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. In Abbildung 20 sind die mit den Enzymen SacII und BsrGI geschnittenen Plasmide pcDNAdest40-NOD1 und -NOD2 sowie die zu erwartenden Bandengrößen aufgezeigt. Die Plasmide weisen die erwarteten Bandenmuster auf. So sind die DNA-Fragmente der geschnittenen Plasmide pcDNAdest40-NOD1 von 1841 bp und 3601 bp nach dem Verdau mit SacII gut zu erkennen. Auch nach der Restriktion des Vektors pcDNAdest40-NOD1 mit dem Enzym BsrGI sind die Banden in Höhe von 2928 bp und 2514 bp deutlich zu sehen. Die mit SacII und BsrGI geschnittenen Plasmide pcDNAdest40-NOD2 sind in der rechten Hälfte der Abbildung sichtbar. Die Plasmide weisen deutliche Banden in Höhe von 2669 bp und 3034 bp bei den SacII-geschnittenen Plasmiden auf. Die mit BsrGI verdauten Vektoren pcDNAdest40-NOD2 liefern Banden einer Basenpaarlänge von 3189 bp und 2514 bp. Durch das korrekte Bandenmuster konnte in den gekennzeichneten Plasmiden der exakte Einbau der NOD1- bzw. NOD2-CDS nachgewiesen werden.

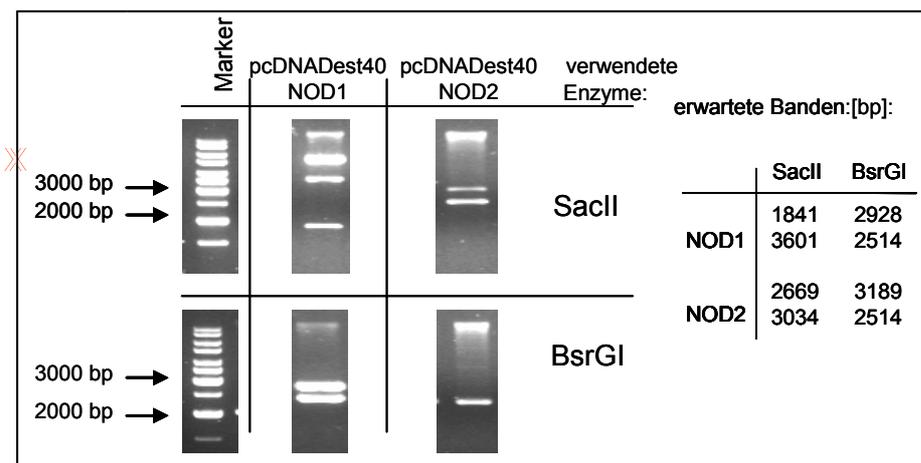


Abbildung 20: Agarosegelelektrophorese (1 %ige Gele) der mit den Enzymen SacII und BsrGI für 90 min bei 37°C geschnittenen Plasmide pcDNAdest40-NOD1 und pcDNAdest40-NOD2

Neben der Generierung der Expressionsvektoren pcDNAdest40-NOD1 und -NOD2 wurden ebenfalls über Gateway LR-Reaktionen Expressionsvektoren hergestellt, bei welchen an den jeweilig eingebauten NOD1- und NOD2-CDS am C-Terminus ein GFP-Protein fusioniert ist. Dabei handelt es sich um die generierten Plasmide pcDNAdest47-NOD1 und -NOD2, welche die spätere Lokalisation der NOD-Proteine in den damit transfizierten Zellen mithilfe des konfokalen Laserscanningmikroskops ermöglichen sollte. Diese Vektoren wurden ebenso wie die vorherigen Plasmide mit einer Restriktionsanalyse auf die richtige Basenpaarzusammensetzung hin überprüft. Hierfür wurden die Enzyme SacII, XmnI und HindIII verwendet. In Abbildung 21 sind die Ergebnisse der Restriktion in Form von Agarosegelen sowie die zu erwartenden Bandengrößen aufgezeigt. In der linken Hälfte sind die Banden in Höhe von 6612 bp und 2673 bp nach dem Verdau des Plasmids pcDNAdest47-NOD2 mit dem Enzym SacII gut zu erkennen. Die Banden nach der Restriktion mit dem Enzym XmnI in Höhe von

5931 bp und 3354 bp sowie die Banden von 3383 bp, 3087 bp, 1553 bp und 1262 bp Größe nach dem Verdau mit dem Enzym HindIII sind im Agarosegel deutlich sichtbar. In der rechten Hälfte des Gels sind die Banden der geschnittenen pcDNAdest47-NOD1-Plasmide aufgetragen. Die Banden nach dem Verdau der Plasmide mit dem Enzym SacII mit den Größen von 7179 bp und 1845 bp sind im oberen Agarosegel klar zu sehen. Ebenso gut erkennbar sind die 5641 bp und 3383 bp großen Plasmidfragmente nach der Restriktion mit dem Enzym HindIII sowie die Banden mit der Länge von 5931 bp, 1982 bp und 1111 bp nach der Inkubation des Plasmids pcDNAdest47-NOD1 mit dem Enzym XmnI. Dies deutet darauf hin, dass die NOD1- bzw. NOD2-CDS gleichermaßen korrekt in das Plasmid pcDNAdest47 transferiert worden sind.

Nach der Bestätigung des korrekten Einbaus der NOD1- bzw. NOD2-CDS in die Expressionsvektoren pcDNAdest40 und pcDNAdest47 konnte mit der Funktionalitätsprüfung dieser Plasmide fortgefahren werden.

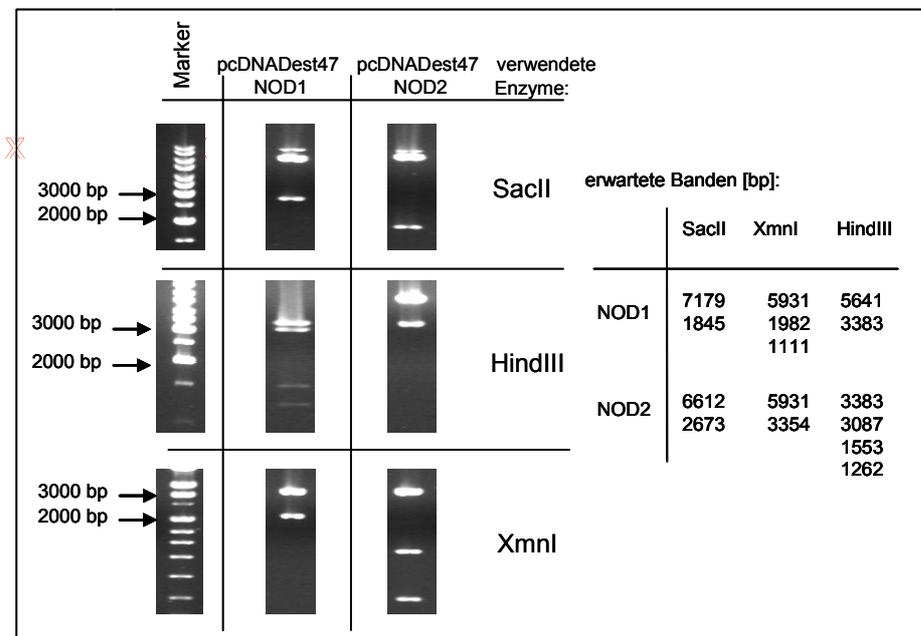


Abbildung 21: Agarosegelelektrophorese (1 %ige Gele) der mit den Enzymen SacII, XmnI und HindIII für 90 min bei 37°C geschnittenen Plasmide pcDNAdest47-NOD1 und pcDNAdest47-NOD2

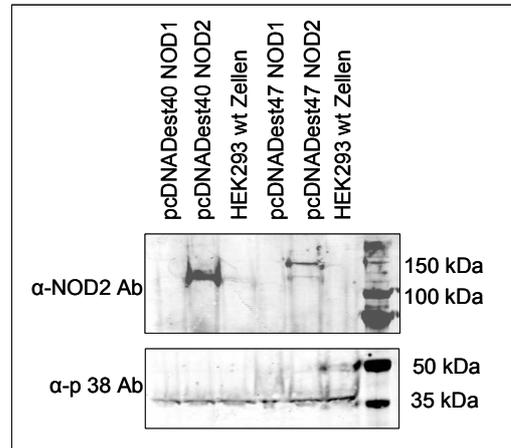
3.7 Funktionalitätstest der generierten NOD1- bzw. NOD2-Plasmide

3.7.1 Proteinnachweis von NOD2 im Westernblot

Um zu überprüfen, ob in den mit 200 ng/2,5 x 10⁵ Zellen pcDNAdest40-NOD2 und pcDNAdest47-NOD2 transfizierten HEK293-Zellen das für das NOD2-Protein kodierende Plasmid transkribiert wird, wurden Zelllysate der transfizierten Zellen hergestellt und diese im Westernblot mit α-NOD2 Ab untersucht. Als Beladungskontrolle wurde die Präsenz der MAP-Kinase Pam3CSK4 als konstitutiv exprimiertes Protein nachgewiesen. In Abbildung 22 sind die Westernblots dargestellt. Deutlich sind die Banden in den Spuren zu erkennen, die mit den Zelllysaten der mit pcDNAdest40-NOD2 und

pcDNADest47-NOD2 transfizierten HEK293-Zellen beladenen sind. Die Bande des α -NOD2 Ab in der Spur der mit pcDNADest40-NOD2 transfizierten HEK293-Zelllysate liegt auf der Höhe von ca. 120 kDa. In der Spur der Zelllysate der mit pcDNADest47-NOD2 transfizierten HEK293-Zellen liegt die α -NOD2 Ab-Bande auf Höhe von 150 kDa. Dies liegt daran, dass ein 27kDa großes GFP-Protein am C-Terminus des NOD2-Proteins fusioniert ist und das Molekulargewicht des fusionierten Proteins dadurch um 27 kDa auf ca. 150 kDa erhöht wird.

Abbildung 22: Westernblot der mit pcDNA-Dest40-NOD2 und pcDNADest47-NOD2 sowie als Kontrolle mit pcDNADest47-NOD1 transfizierten HEK293 Zellen. NOD2 wurde mit α -NOD2 Ab detektiert und als Beladungskontrolle diente der Nachweis von p 38 mittels α -p38 Ab

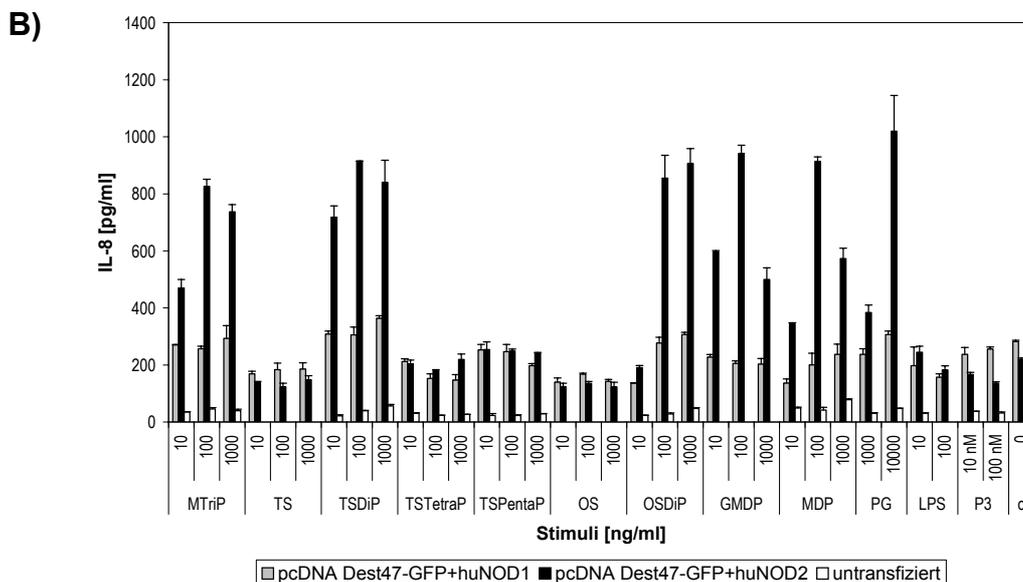
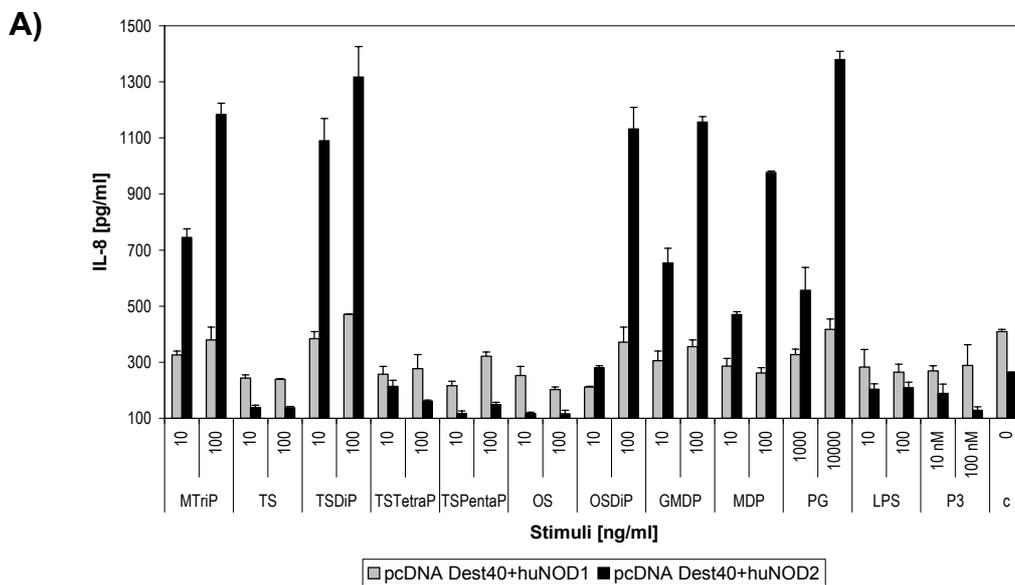


Mit dem Westernblot in Abbildung 22 konnte gezeigt werden, dass NOD2 in den mit pcDNADest40-NOD2 und pcDNADest47-NOD2 transfizierten HEK293-Zellen als Protein vorliegt. Zusammen mit den Ergebnissen aus den Abbildungen 24 A) und B) kann dadurch auf das Vorhandensein eines funktionalen NOD2-Proteins in mit pcDNADest40-NOD2 und pcDNADest47-NOD2 transfizierten HEK293-Zellen geschlossen werden.

3.7.2 pcDNA3NOD1 und -NOD2

Um die Funktionalität der als Vorlage für die NOD1- und NOD2-CDS verwendeten pcDNA3NOD1- und pcDNA3NOD2-Plasmide zu überprüfen und um nachzuweisen, dass die synthetischen Peptidoglykanstrukturen von den intrazellulären NOD-Proteinen erkannt werden, wurden HEK293-Zellen transient mit $200 \text{ ng}/2,5 \times 10^5$ HEK293-Zellen pcDNA3NOD1 und pcDNA3NOD2 transfiziert und anschließend mit 1, 10, 100, 1000 und 10000 ng/ml synthetischen Peptidoglykanstrukturen (TS, TSDiP, OS; OSDiP, GMDP, MDP) stimuliert. In den Überständen wurde dann im ELISA das Zytokin IL-8 als Inflammationsmarker nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt. Klar sichtbar sind die IL-8-Ausschüttungen der pcDNA3 NOD2 transient transfizierten HEK293-Zellen nach der Stimulation mit den auch in humanen MNCs und Monozyten aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen. Dies deutet auf eine Erkennung der inflammatorisch aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen über das NOD2-Protein hin. Wie auch schon im nativen humanen System beobachtet (siehe Punkt 3.1), können nur die synthetisch hergestellten Peptidoglykanfragmente mit einer Aminosäureseitenkette von mindestens zwei und höchstens drei Aminosäuren die mit pcDNA3NOD2 transient transfizierten HEK293-Zellen zur IL-8-Freisetzung anregen. Die Anzahl der Saccharideinheiten spielt dabei keine Rolle. Die Kontrollsubstanzen LPS und PAM3CSK4 induzieren keine Freisetzung des Inflammationsmarkers IL-8. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass neben einem

wurden die transfizierten HEK293-Zellen mit Peptidoglycan von *E.coli* stimuliert. Dieses Peptidoglycan eines Gram-negativen Bakteriums beinhaltet neben dem NOD2-Stimulus Muramyl-dipeptid (MDP) auch die NOD1-stimulierenden Strukturen ie-DAP. Wie in Abbildung 24 C) ersichtlich, kann durch die *E.coli* PG-bedingte IL-8 Ausschüttung der pcDNADest40 NOD1-transfizierten HEK293-Zellen auf eine Funktionalität des Plasmids geschlossen werden. Bei den untransfizierten HEK293-Zellen ist nach der Stimulation mit synPG ebenfalls kein IL-8 im Medium nachweisbar. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die synthetischen Peptidoglykanstrukturen mit den aus mindestens zwei und maximal drei Aminosäuren bestehenden Seitenketten tatsächlich von NOD2 erkannt werden und an der Ausschüttung des Inflammationsmarkers IL-8 beteiligt sind. Ferner ist deutlich geworden, dass das dem NOD2-Protein am C-Terminus anhängende GFP-Protein für die Erkennung der NOD2-Agonisten nicht hinderlich ist.



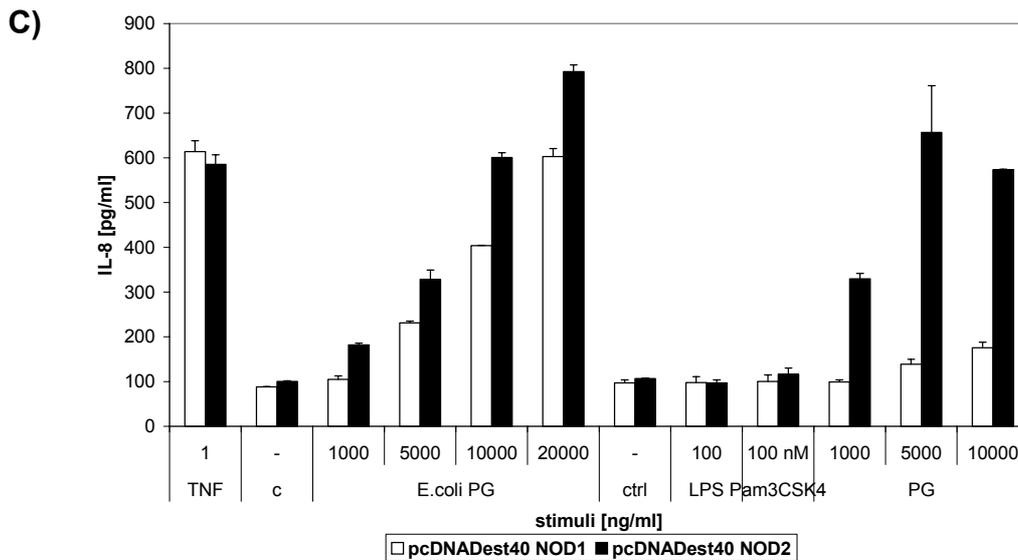


Abbildung 24: Bestimmung der IL-8-Konzentration in Überständen stimulierter und mit pcDNAdest40-NOD1 und-NOD2 (A) und C)) und pcDNAdest47-NOD1 und -NOD2 (B)) transient transfizierter HEK293-Zellen mittels ELISA

3.8 Einfluss von CD14 auf die Erkennung synthetischer Peptidoglykanstrukturen

Manukyan *et al.*⁶⁹ konnten zeigen, dass das Rezeptormolekül CD14 einen additiven Effekt bei der Erkennung von Pam3CSK4 durch TLR2 und bei der Erkennung von LPS durch TLR4 hat. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch bei der Erkennung von synthetischen Peptidoglykanstrukturen durch NOD2 auftritt, wurden HEK293-Zellen transient mit $200 \text{ ng}/2,5 \times 10^5$ Zellen pcDNAdest40-NOD2 und $25 \text{ ng}/2,5 \times 10^5$ Zellen pcDNA3 CD14 transfiziert und die HEK293-Zellen anschließend mit 10, 100 und 1000 ng/ml synthetischer Peptidoglykanstrukturen (MDP, MTriP, TS; TSDiP, TSTetraP) stimuliert. In den Überständen wurde mittels ELISA das inflammatorische Zytokin IL-8 detektiert.

In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass eine Kotransfektion von pcDNA3 CD14 mit pcDNAdest40-NOD2 in HEK293-Zellen keinen Einfluss auf die Ausschüttung von IL-8 nach Stimulation mit synthetischen Peptidoglykanstrukturen hat. Die erkennbaren leichten Differenzen in der IL-8-Ausschüttung liegen im Rahmen der natürlichen Schwankungen und sind nicht auf den Einfluss des Adaptormoleküls CD14 zurückzuführen.

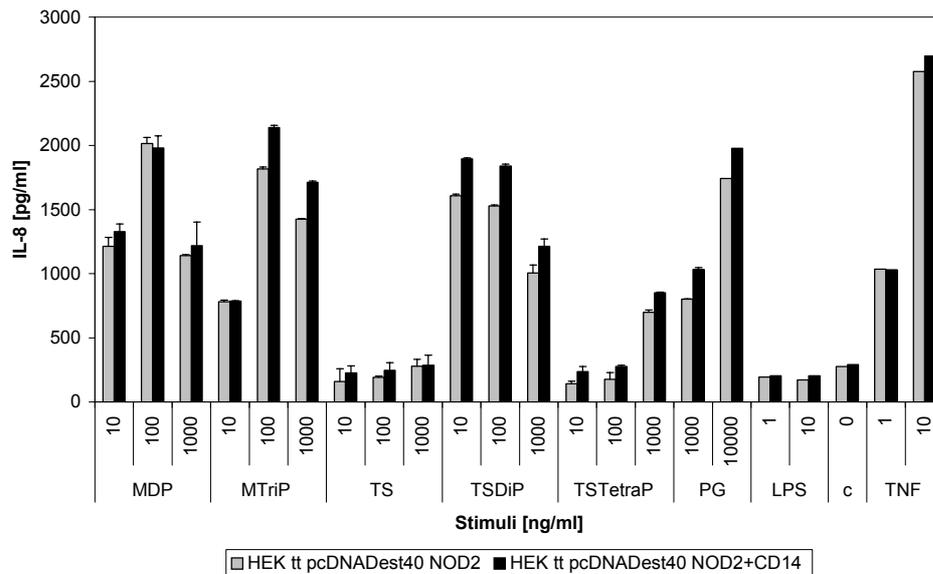


Abbildung 25: Bestimmung der IL-8-Konzentration in Überständen 18 h stimulierter und mit pcDNAdest40-NOD2 und pCEP4 CD14 transient transfizierter HEK293-Zellen mittels ELISA

3.9 Untersuchungen antagonistischer Effekte

Um einen möglichen antagonistischen Effekt der inflammatorisch inaktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen mit mehr als drei Aminosäuren in den Peptidseitenketten bei der Erkennung der inflammatorisch aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen aufdecken zu können, wurden primäre humane mononukleäre Zellen und mit pcDNAdest40-NOD2 transfizierte HEK293-Zellen mit 100 bzw. 1000 ng/ml des inaktiven Tetrasaccharidpentapeptids für 30 min bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit den synthetischen Peptidoglykanstrukturen stimuliert. Die Überstände wurden anschließend im IL-8-ELISA analysiert. Hintergrund für diese Untersuchungen sind Überlegungen, einen möglichen Antagonisten zu den aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen als Ansatzpunkt einer Therapie für NOD2-abhängige Krankheiten zu entwickeln.

3.9.1 Einfluss von TSPentaP auf HEK293-Zellen

Die Ergebnisse der Vorinkubationsversuche mit pcDNAdest40-NOD2 transfizierten HEK293-Zellen sind in Abbildung 26 dargestellt. Wie zu erkennen ist, hat die Vorinkubation weder mit 100 ng/ml noch mit 1000 ng/ml inaktivem TSPentaP einen antagonistischen Effekt auf die Ausschüttung von IL-8 nach Stimulation mit 10 und 100 ng/ml synthetischen Peptidoglykanstrukturen (GMDP, MDP, MTriP, TSDiP, TSTriP, TSTetraP, OSDiP). Die Mengen des bei den vorinkubierten Zellen gemessenen inflammatorischen Markers IL-8 unterscheiden sich nicht von den Mengen der HEK293-Zellen, welche nicht mit dem inaktiven TSPentaP vorinkubiert wurden.

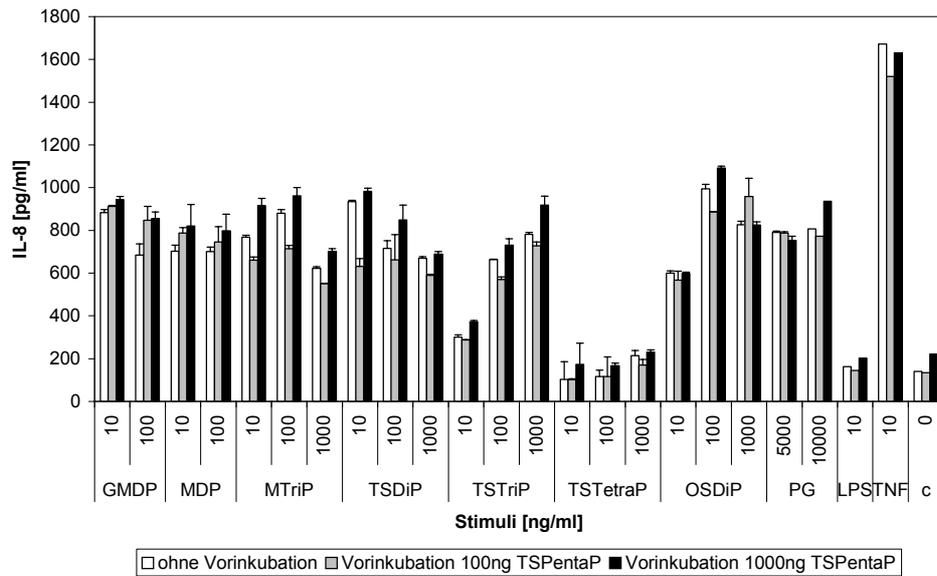


Abbildung 26: Bestimmung der IL-8-Konzentration in Überständen 18 h stimulierter, mit 100 und 1000 ng/ml TSPentaP vorinkubierter und mit pcDNAdest40 NOD2 transient transfizierter HEK293-Zellen mittels ELISA

3.9.2 Einfluss von TSPentaP auf humane Monozyten

Neben den Vorinkubationsversuchen mit transfizierten HEK293-Zellen wurde der mögliche antagonistische Effekt der inaktiven synPG-Struktur TSPentaP auch bei humanen mononukleären Zellen (MNCs) untersucht. Hierzu wurden MNCs mit 100 ng/ml bzw. 1000 ng/ml TSPentaP vorinkubiert und anschließend mit 10 und 100 ng/ml synthetischen petidoglykanstrukturen (GMDP; MDP; MTriP, TSDiP, TSTriP, TSTetraP, OSDiP) stimuliert. Der Überstand wurde im ELISA auf das Vorhandensein von TNF untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 zu sehen. Ebenso wie bei den vorinkubierten HEK293-Zellen ist bei den mit TSPentaP vorinkubierten MNCs kein Einfluss des inaktiven TSPentaP zu beobachten. Somit lässt sich sagen, dass die inaktive synthetische Peptidoglykanstruktur TSPentaP keinen antagonistischen Effekt auf aktive synthetischen Peptidoglykanstrukturen in humanen Monozyten und in mit pcDNAdest40-NOD2 transfizierten HEK293-Zellen hat.

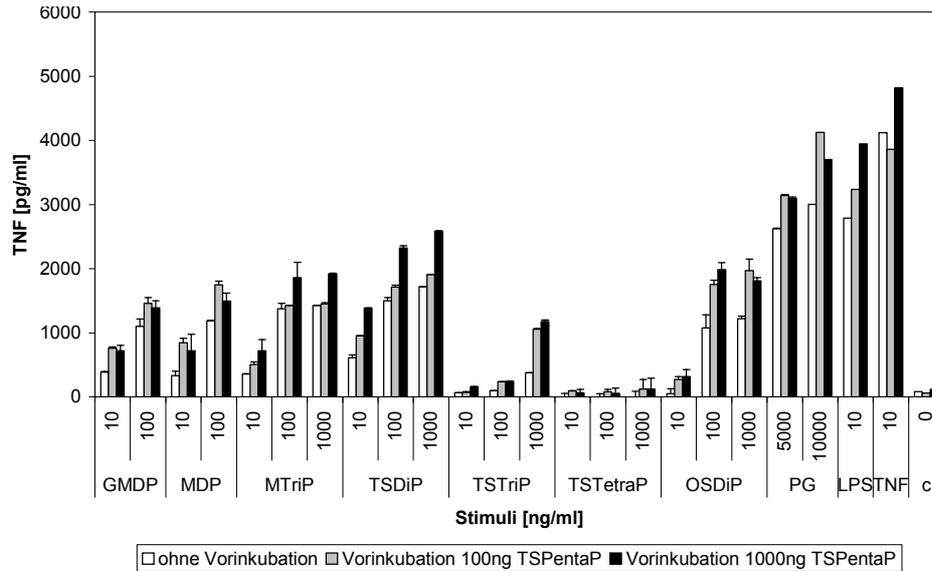


Abbildung 27: Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 4 h stimulierter und mit 100 und 1000 ng/ml TSPentaP vorinkubierter MNCs mittels ELISA

3.10 Stimulationskinetik synthetischer Peptidoglykanstrukturen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass synthetischen Peptidoglykanstrukturen mit Peptidketten aus zwei bis drei Aminosäuren, unabhängig von der Anzahl der Saccharideinheiten, primäre humane Immunzellen zur Ausschüttung von TNF- α stimulieren können, und dass dieser Mechanismus über das intrazelluläre Rezeptormolekül NOD2 vermittelt wird, stellte sich die Frage, wie die Kinetik dieses Aktivierungsprozesses verläuft.

Um einen ersten Überblick über die Kinetik der Stimulation zu erhalten, wurden humane Monozyten über einen Zeitraum von vier Stunden in zeitlichen Abständen von 0, 60, 90, 120 und 240 min mit 100 ng/ml TS, TSDiP, TSTriP und MDP sowie 10 ng/ml LPS und 100 nM PAM3CSK4 als Kontrollansätze stimuliert und die Überstände anschließend abgenommen. Im ELISA wurde nachfolgend der Gehalt des inflammatorischen Zytokins TNF- α gemessen. Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, ist eine deutliche TNF- α -Ausschüttung erst nach 240 min Stimulation mit aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen (MDP, TSDiP und TSTriP) zu sehen. Die über die extrazellulären Rezeptoren TLR4 bzw. TLR2 erkannten Stimuli LPS und PAM3CSK4 hingegen induzieren bereits nach einem Zeitraum von 90 min bei LPS bzw. 120 min bei PAM3CSK4 eine Ausschüttung von TNF- α in humanen Monozyten. Ein möglicher Grund für die frühe TNF- α -Ausschüttung kann in der direkten Erkennung dieser Stimuli durch extrazellulären TLR2 bzw. TLR4 liegen, wobei die Erkennung ohne Aufnahme der Substanz in die Zelle erfolgt.

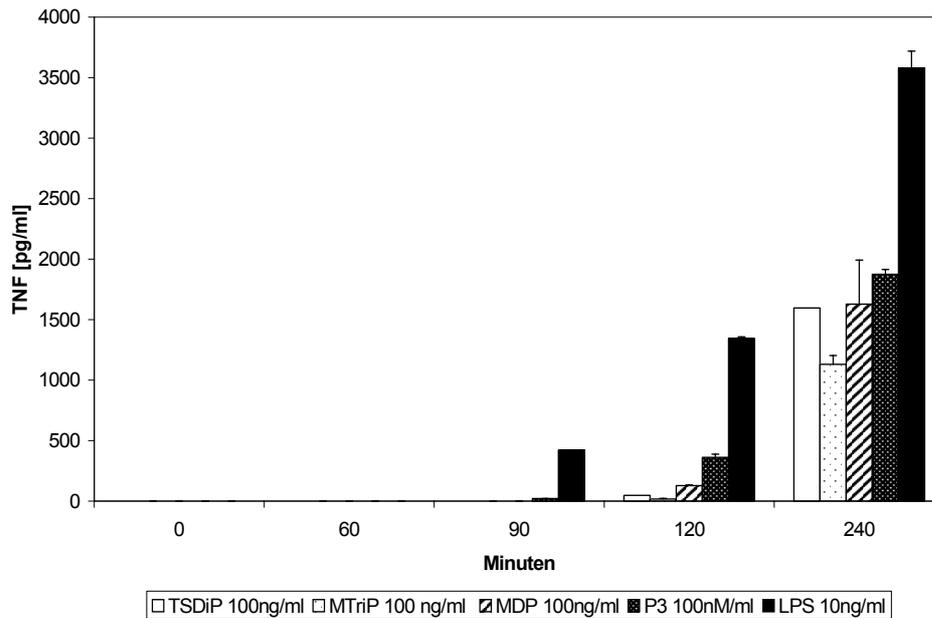


Abbildung 28: Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 0, 60, 90, 120 und 240 min stimulierter humaner Monozyten mittels ELISA

3.11 Nachweis der p65-Translokation in Monozyten

Um die Frage der genauen Stimulationskinetik der aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen zu untersuchen, sollten immunhistochemische Färbungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern an der NF- κ B-Untereinheit p65 durchgeführt werden. Diese Untereinheit wird nach Stimulation mit inflammatorisch aktiven Substanzen durch Phosphorylierung der Einheit I κ B- α von dieser abgetrennt und wandert zusammen mit der Untereinheit p50 zur Signalweitergabe in den Zellkern. Diese Wanderung sollte durch konfokale Laserscanningmikroskopie dokumentiert werden.

Etablierung der konfokalen Laserscanningmikroskopie

Zuerst wurde die Methode der Translokationsstudien von p65 anhand 60 min stimulierter Monozyten mit einer aktiven (100 ng/ml TSDiP) und einer inaktiven (100 ng/ml TSTetraP) synthetischen Peptidoglykanstruktur sowie mit 100 nM Pam3CSK4 verifiziert. Um eine genaue Aussage über die Lokalisation der p65-Untereinheit treffen zu können, wurde der Zellkern mit dem Nukleinsäurefarbstoff TOTO-3-iodid angefärbt. Der p65-Ab wurde mit einem sekundären fluoreszenzgekoppelten Ab sichtbar gemacht. In Abbildung 29 sind die konfokalen Aufnahmen der immunhistochemisch gefärbten Monozyten dargestellt.

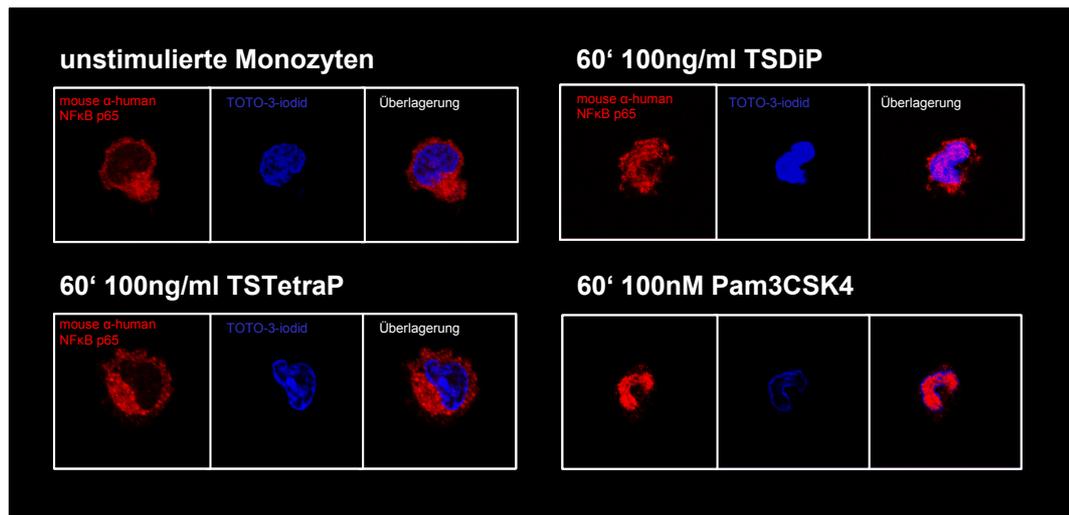


Abbildung 29: Konfokale Laserscanningmikroskopie der für 60 min mit je 100 ng/ml TSDiP und TSTetraP sowie 100 nM Pam3CSK4 stimulierten Monozyten. In rot dargestellt ist die p65-Untereinheit, in blau sind die Nucleinäre zu erkennen

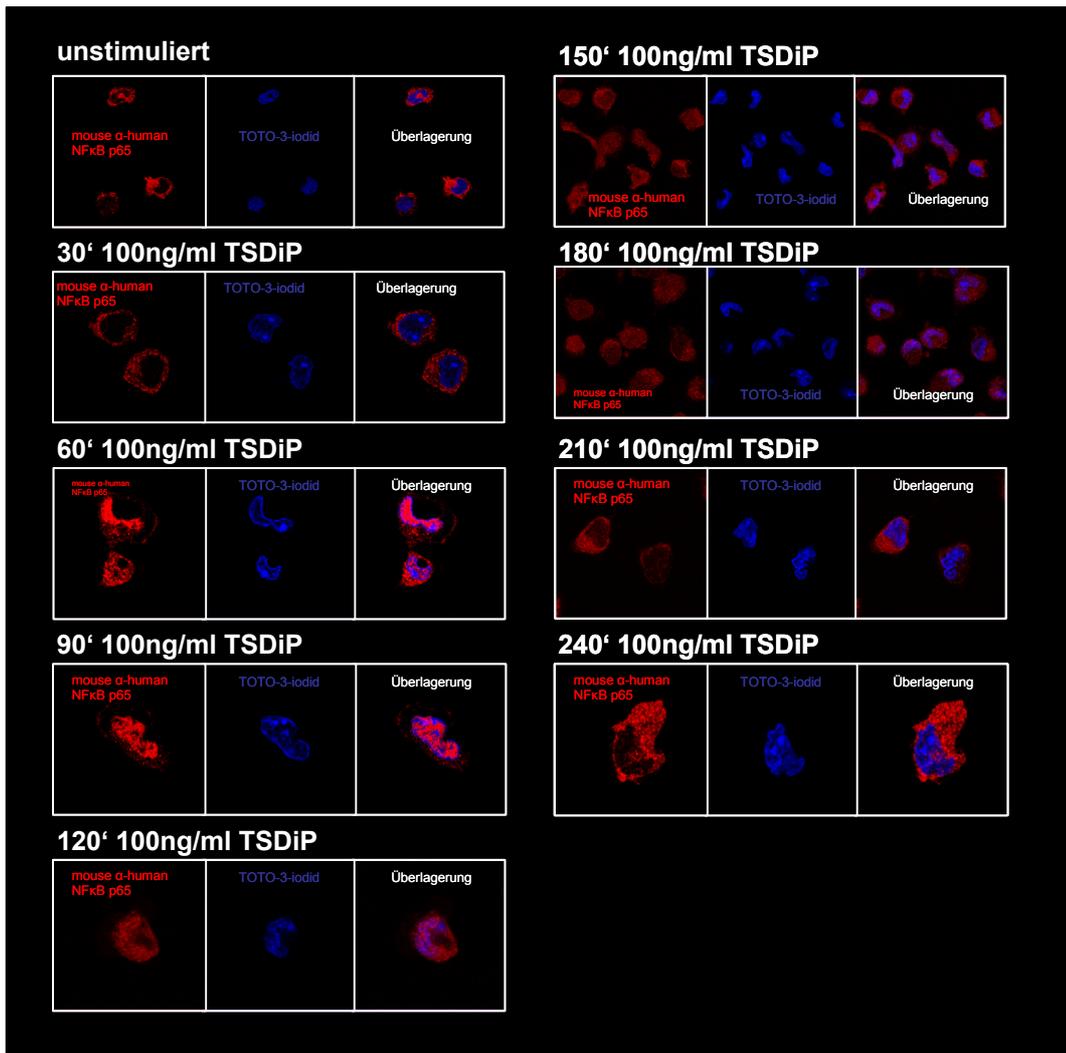
Die unstimulierten Monozyten weisen keine Lokalisation der p65-Untereinheit im nukleinsäurereichen Zellkern auf. Ebenso verhalten sich die mit der inaktiven synPG Struktur TSTetraP inkubierten Monozyten: Die p65-Untereinheit verbleibt im Zytoplasma.

Das Gegenteil ist nach der Stimulation der Monozyten mit der aktiven Substanz TSDiP zu beobachten: Die p65-Untereinheit kolokalisiert teilweise mit dem Nucleinsäurefarbstoff im Zellkern. Nach Stimulation mit Pam3CSK4 kann dieser Effekt ebenfalls, jedoch viel stärker beobachtet werden, was erneut auf eine unterschiedliche Aktivierungskinetik hindeutet. Die p65-Untereinheit ist vollständig im Zellkern lokalisiert. Diese Beobachtung wird von den Ergebnissen von Girardin *et al.*⁵¹ unterstützt, die zeigen konnten, dass das Monosaccharid Muramyldipeptid (MDP) bei Stimulation von transfizierten HEK293-Zellen eine Aktivierung von NF-κB induziert.

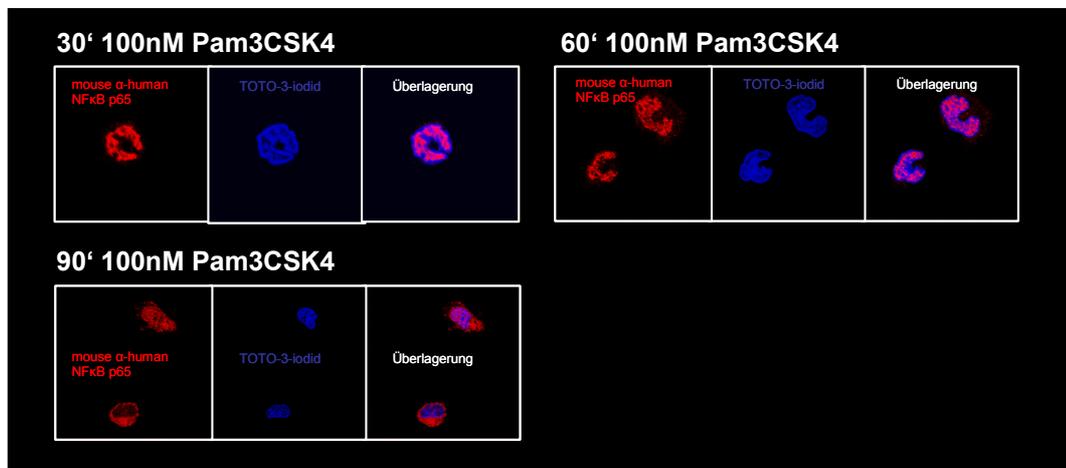
Stimulationkinetik mit TSDiP stimulierter Monozyten

Um die Kinetik der Stimulation mit der aktiven synthetischen Peptidoglykanstruktur TSDiP beobachten zu können, wurden humane Monozyten über Zeitspannen von 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 und 240 min mit 100 ng/ml des TSDiP stimuliert und anschließend die Nucleinsäuren mit TOTO-3-iodid und die p65-Untereinheit des NF-κB mit α-human p65 Antikörper und fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörper gefärbt. Als Positivkontrolle wurden humane Monozyten mit 100 nM Pam3CSK4 über die Zeiträume 30, 60 und 90 min stimuliert und anschließend die Nucleinsäuren sowie die p65-Untereinheit gefärbt. Die Detektion erfolgte am konfokalen Laserscanningmikroskop. Parallel wurden die Überstände der gefärbten Monozyten im TNF-α-ELISA untersucht um sicherzugehen, dass die Stimulation zur Freisetzung des inflammatorischen Zytokins TNF-α geführt hat. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 A), B) und C) dargestellt.

A)



B)



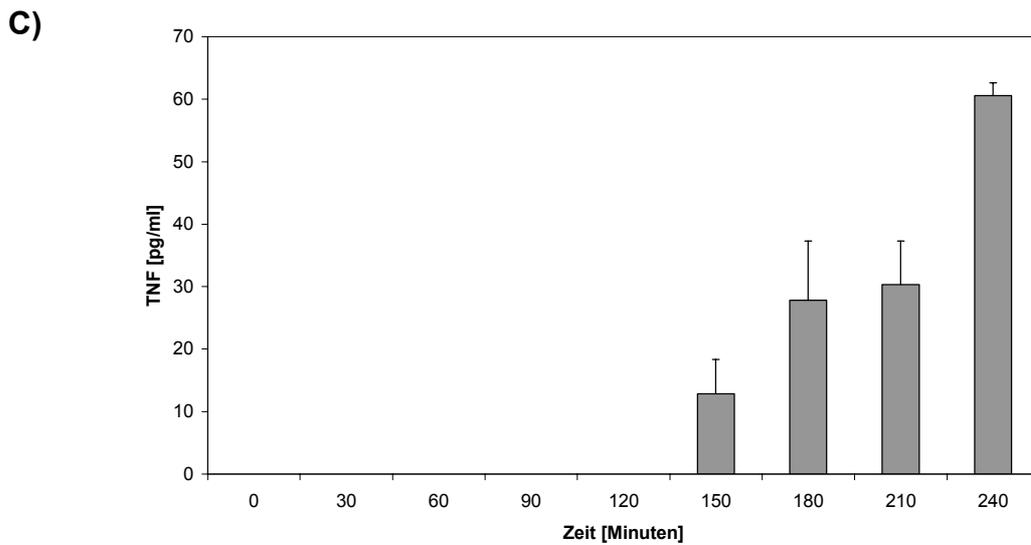


Abbildung 30: A) Konfokale Laserscanningmikroskopie der p65-Translokation in humanen Monozyten nach Stimulation für 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 und 240 min mit 100 ng/ml TSDiP (A)) und für 30, 60 und 90 min mit 100 nM Pam3CSK4 (B); C)) Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen für 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 und 240 min mit 100 ng/ml TSDiP stimulierter humaner Monozyten mittels ELISA

In Abbildung 30 A) ist zu erkennen, dass die Stimulation der humanen Monozyten mit TSDiP nach 30 min keine p65-Translokation in den Zellkern induziert hat. Erst nach 60 min Stimulationszeit ist eine Lokalisation des roten Signals im nukleinsäurereichen Zellkern zu beobachten. Diese Kolo-kalisation der Nukleinsäuren im Zellkern und der p65-Untereinheit des NF- κ B ist nach 90 min Stimulation ebenso zu beobachten wie nach der Stimulation von 60 min. Nach einer Inkubationszeit von 120 min ist die p65-Untereinheit zum Teil in das Zytoplasma zurückgewandert. Dieser Effekt ist nach 150 und 180 min Stimulation ebenfalls zu detektieren. Zu einem Zeitpunkt von 210 und 240 min nach der Zugabe des Stimulus ist keine p65-Untereinheit mehr im Zellkern zu beobachten.

Die Stimulation humaner Monozyten mit Pam3CSK4 in Abbildung 30 B) zeigt, dass eine Stimulationszeit von 30 min genügt, um eine p65-Translokation in den Zellkern beobachten zu können. Diese Translokation ist nach 60 min Stimulation ebenso detektierbar. Nach einer Stimulationszeit von 90 min ist die p65-Untereinheit teilweise in das Zytoplasma zurückgewandert und teilweise ist p65 im Zellkern lokalisierbar. Dies deutet darauf hin, dass die Stimulation mit Pam3CSK4 im Vergleich zur Stimulation mit synthetischen Peptidoglykanstrukturen eine schnellere NF κ B-Aktivierung hervorruft.

Die zur Positivkontrolle untersuchten Überstände der gefärbten Zellen beinhalten nach einer Stimulationszeit von 150 min erste TNF- α -Mengen (Abbildung 30 C)). Die Konzentrationen des TNF- α steigen mit längeren Stimulationszeiten an. Dies lässt auf eine erfolgreiche Stimulation der Zellen mit TSDiP schließen.

3.12 Nachweis der MAP-Kinase-Aktivierung

Da in Abbildung 30 eine im Vergleich zu den mit Pam3CSK4 stimulierten Monozyten verzögerte p65-Translokation beobachtet werden konnte, sollten nun die Phosphorylierungen der MAP-Kinasen ERK, p38 und JNK über die Zeit von 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 und 240 min beobachtet werden. Hierzu wurden Westernblots mit Zellysaten von Monozyten durchgeführt, welche zuvor über diese Zeitspan-

nen mit aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen (je 100 ng/ml MDP und TSDiP) und LPS (10 ng/ml) als Kontrolle stimuliert wurden. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis der konstitutiv exprimierten und unphosphorylierten MAP-Kinase ERK. In Abbildung 31 sind die Ergebnisse dargestellt.

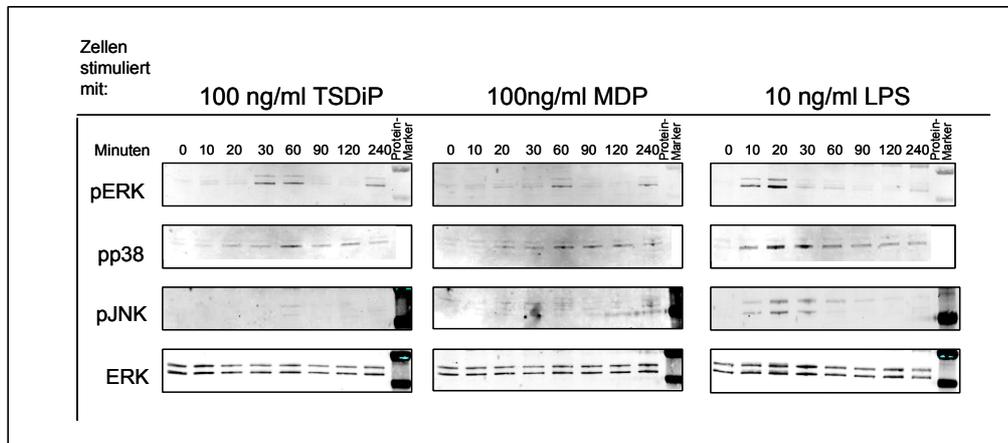


Abbildung 31: Nachweis der ERK-, p38-, JNK-Phosphorylierung zu den Zeitpunkten 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 und 240 min nach Stimulation von Monozyten mit je 100 ng/ml MDP und TSDiP sowie 10 ng/ml LPS

Es ist zu erkennen, dass die mit LPS stimulierten Monozyten nach 10 min eine Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK, p38 und JNK aufweisen, welche nach 20-30 min das Maximum erreichen. Danach wird die Phosphorylierung der Proteine langsam wieder abgebaut. Bei der Stimulation der Monozyten mit der Substanz TSDiP hingegen ist eine Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK erst nach 30 min zu beobachten. Die Phosphorylierung von p38 weist nach 60 min das Maximum auf. Nach Stimulation der Monozyten mit MDP ist nach 60 min eine Phosphorylierung von ERK zu erkennen und auch p38 ist zu diesem Zeitpunkt maximal phosphoryliert. Die Aktivierung der MAP-Kinase JNK ist nach Stimulation mit MDP kaum nachzuweisen. Somit lässt sich sagen, dass die Phosphorylierung der MAP-Kinasen als Zeichen der inflammatorischen Aktivität im Vergleich zu einer Stimulation mit LPS in den mit TSDiP und MDP stimulierten Monozyten um 20 bis 50 min verzögert auftritt. Um diese Verzögerung in der MAP-Kinasen-Phosphorylierung erklären zu können, wurden anschließend Untersuchungen zum Transport der synthetischen Peptidoglykanstrukturen in die Zelle durchgeführt.

3.13 Phagozytose-Assay

Um klären zu können, über welchen Mechanismus die aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen in die Zelle gelangen, wurden Untersuchungen am FACS, am konfokalen Laserscanningmikroskop, mithilfe des ELISA und des Westernblots durchgeführt. Dabei wurden HEK293-Zellen und Monozyten mit verschiedenen phagozytose- und makropinozytosehemmenden Substanzen für 30 min vorinkubiert und anschließend mit den synthetischen Peptidoglykanstrukturen stimuliert. Als Phagozytosehemmer kamen die Substanz Cytochalasin D (CytD; 3 μM), Monodansylcadaverine (MDC; 100 μM) und 0,1% Azid zum Einsatz. Die verwendete makropinozytosehemmende Substanz war 5-(N-ethyl-N-isopropyl) Amilorid (EIPA; 1 μM).

3.13.1 FACS-Analyse

Um die Hemmung der Phagozytose bzw. der Makropinozytose durch die Substanzen CytD (3 μM), MDC (100 μM), Azid (0,1 %) und EIPA (1 μM) nachweisen zu können, wurden humane Monozyten mit den genannten Substanzen 30 min vorinkubiert und anschließend mit 10 FITC-gekoppelten Latexbeads pro Zelle für 4 h inkubiert. Die Fluoreszenz der phagozytierten FITC-gekoppelten Latexbeads wurde dann im FACS analysiert. Als Kontrollen dienten jeweils die mit den in den angegebenen Mengen DMSO gelösten Phagozytose- bzw. Makropinozytosehemmern inkubierten Monozyten. Die Ergebnisse der FACS-Analyse sind in Abbildung 32 dargestellt.

Die linke Population im Histogramm stellt die nicht-fluoreszierenden Monozyten dar, welche keine FITC-gekoppelten Latexbeads phagozytiert haben, und als rechte Population im Histogramm sind die fluoreszierenden Monozyten zu erkennen, welche die FITC-gekoppelten Latexbeads phagozytiert haben. Dabei erscheinen Zellen mit unterschiedlichen Mengen phagozytierten FITC-gekoppelter Latexbeads als eigene Populationen. An der reduzierten Fluoreszenz der mit phagozytosehemmenden und makropinozytosehemmenden Substanzen behandelten und mit FITC-gekoppelten Latexbeads inkubierten Monozyten ist zu erkennen, dass sämtliche Substanzen die Aufnahmen der FITC-gekoppelten Latexbeads hemmen. Die effektivste Hemmung ist nach der Vorinkubation der Monozyten mit 0,1% Azid zu beobachten. Die Zellen weisen eine Reduktion der Fluoreszenz von 42,4 % auf. Nach der Vorinkubation mit CytD ist die Fluoreszenz der Monozyten um 38,7 %, nach der Behandlung mit dem Makropinozytosehemmer EIPA um 22,5 % und nach der Vorinkubation mit MDC um 21 % reduziert. Eine stärkere Hemmung der Phagozytose bzw. Makropinozytose konnte auch nach Erhöhung der Substanzkonzentrationen nicht erzielt werden.

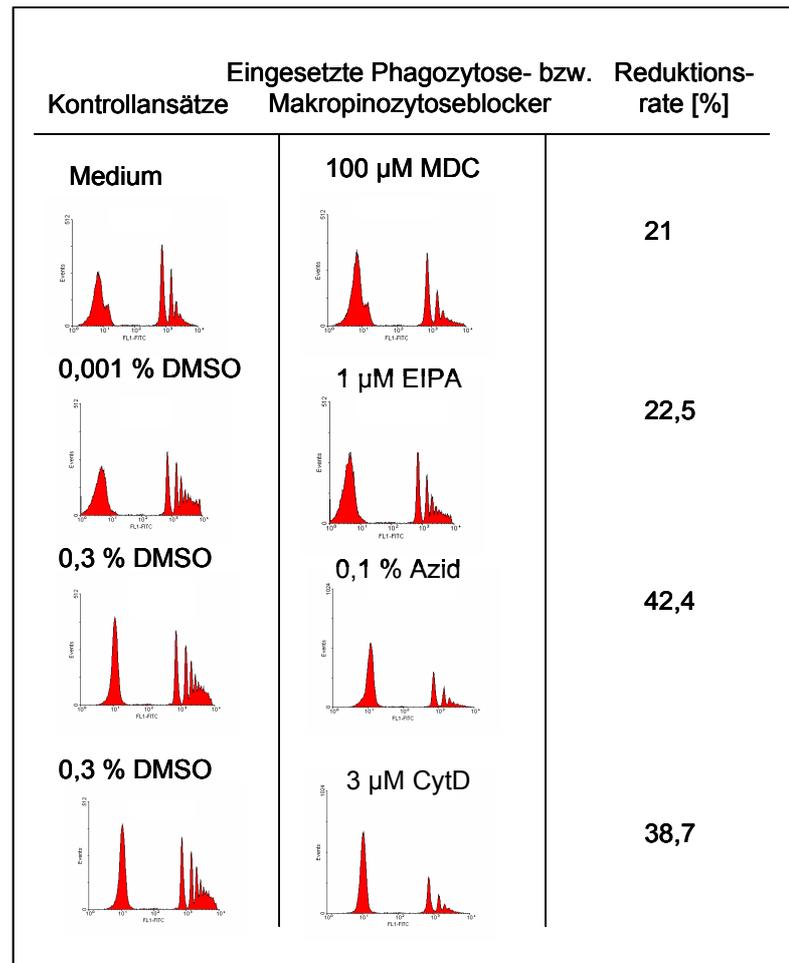


Abbildung 32: FACS-Analyse der mit phagozytosehemmenden (100 µM MDC, 0,1 % Azid, 3 µM CytD) und makropinozytosehemmenden Substanzen (1 µM EIPA) für 30 min vorbehandelten und mit 10 FITC-gekoppelten Latexbeads/phagozytierende Zelle für 4 h inkubierten Monozyten

3.13.2 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Die phagozytosehemmenden Eigenschaften der Substanzen CytD, MDC und Azid wurden mithilfe der konfokalen Laserscanningmikroskopie verifiziert. Dabei wurden humane Monozyten mit den genannten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen vorinkubiert und anschließend mit 10 FITC-gekoppelten Latexbeads pro Zelle für 4 h inkubiert. Anschließend wurden immunhistochemische Färbungen der Zellmembran mit anti-CD14 Antikörpern und des Zellkerns mit TOTO-3-iodid durchgeführt. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte am konfokalen Laserscanningmikroskop.

Bei den unbehandelten Monozyten sind neben der durch das rote Fluoreszenzsignal erkennbaren Zellmembran und den blau-fluoreszierenden Nukleinsäuren im Zellkern die phagozytierten FITC-gekoppelten Latexbeads in der Zelle zu erkennen. Die mit MDC, Azid und CytD behandelten Zellen weisen keine intrazelluläre Lokalisation der FITC-gekoppelten Latexbeads auf. Dies bestätigt darüber hinaus die FACS-Ergebnisse, dass die Aufnahme der Latexbeads durch die Vorinkubation mit den phagozytosehemmenden Substanzen blockiert wurde.

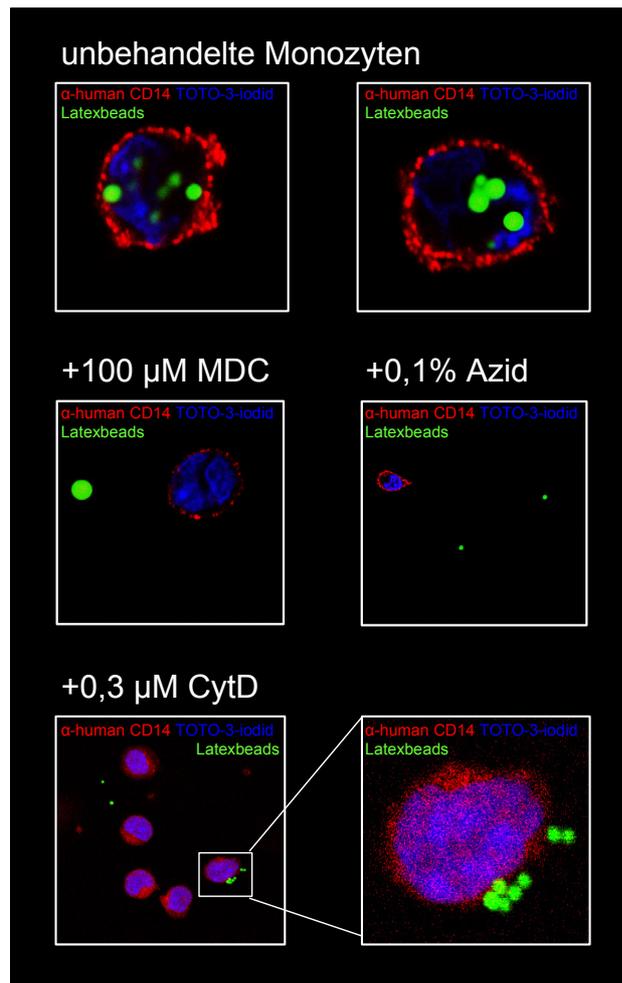


Abbildung 33: Konfokale Laserscanningmikroskopie der mit phagozytose-hemmenden (100 µM MDC, 0,1 % Azid, 3 µM CytD) Substanzen für 30 min vorbehandelten und mit 10 FITC-gekoppelten Latexbeads/phagozytierende Zelle für 4 h inkubierten Monozyten

3.13.3 Untersuchungen der p65-Translokation

Um den Effekt von 1 µM EIPA auf die Signaltransduktion von Monozyten untersuchen zu können, wurden p65-Translokationsstudien am konfokalen Laserscanningmikroskop durchgeführt. Hierzu wurden Monozyten vor der Stimulation mit 100 ng/ml TSDiP mit 1 µM EIPA für 30 min vorinkubiert und anschließend immunhistochemische Färbungen der NFκB-Untereinheit p65 und der Nukleinsäuren durchgeführt (Abbildung 34).

Wie bereits in Abbildung 30 A) gezeigt werden konnte, ist eine p65-Translokation in den nukleinsäurereichen Zellkern nach einer 60-minütigen Stimulation mit 100 ng/ml TSDiP zu beobachten. Nach einer Vorinkubation der Monozyten mit der makropinozytosehemmenden Substanz EIPA kann keine p65-Translokation in den Zellkern nachgewiesen werden. Die NFκB-Untereinheit p65 bleibt nach Stimulation mit TSDiP im Zytoplasma lokalisiert. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Inkubation mit der Substanz EIPA die Translokation von p65 beeinflussen, hingegen keinen Effekt auf die TNF-α-Ausschüttung von Monozyten nach Stimulation mit TSDiP hat.

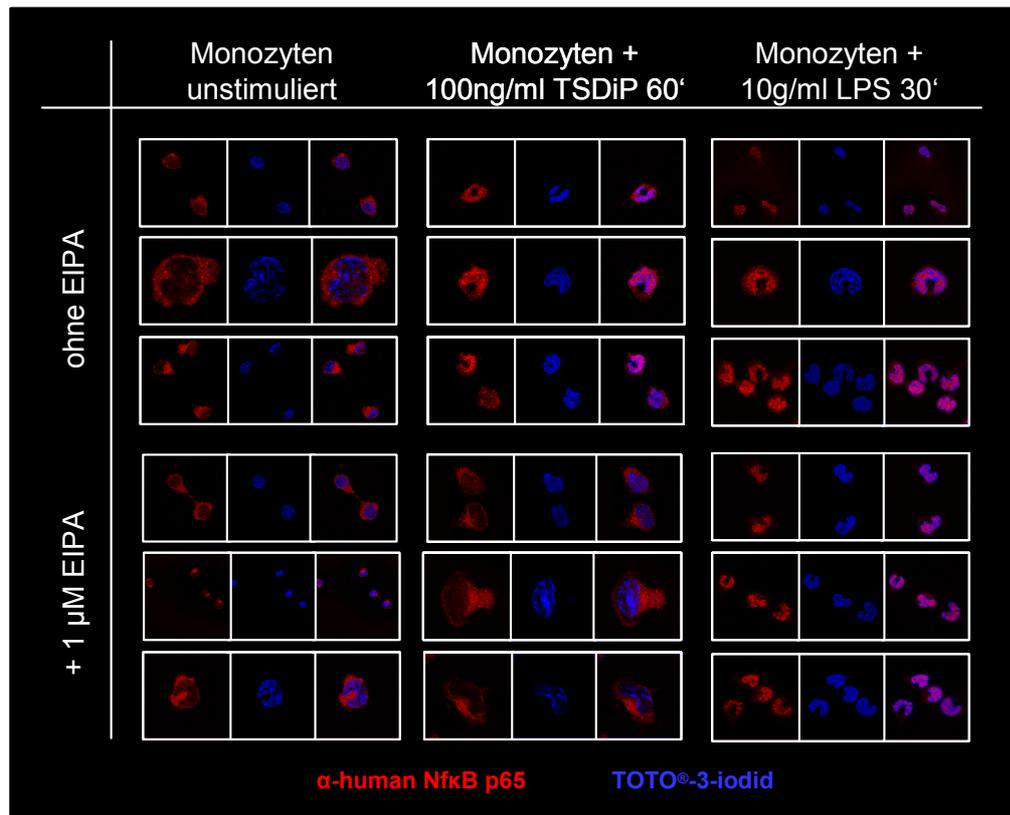


Abbildung 34: Konfokale Lasses scanningmikroskopie zur p65-Translokation der mit 1 μM EIPA für 30 min vorinkubierten und mit 100 ng/ml TSDiP stimulierten Monozyten. Rot ist die NF κ -B-Untereinheit p65 dargestellt, blau sind die Nukleinsäuren gefärbt.

3.13.4 TNF- α -ELISA

MNCs bzw. humane Monozyten wurden zur Überprüfung des Einflusses von phagozytose- bzw. makropinozytosehemmenden Substanzen auf die stimulatorische Aktivität der aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen nach 30-minütiger Vorinkubation mit den phagozytosehemmenden Substanzen CytD (3 μM), MDC (100 μM) und Azid (0,1 %) sowie der makropinozytosehemmenden Substanz EIPA (1 μM) mit aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen stimuliert. Der Überstand der Zellen wurde anschließend im TNF- α -ELISA analysiert.

Vorinkubation mit 3 μM Cytochalasin D (CytD)

In Abbildung 35 sind die Ergebnisse des TNF- α -ELISA der MNCs, die mit 3 μM CytD vorbehandelt wurden, dargestellt. Die grauen Balken stellen die Werte der unbehandelten MNCs dar, die schwarzen Balken sind den mit CytD behandelten MNCs zuzuordnen. Die Ausschüttung von TNF- α erreicht nach der Blockade der Phagozytose das gleiche Niveau wie bei den unbehandelten MNCs. Bei dem Stimulus Zymosan ist eine Reduktion der TNF- α -Ausschüttung um ca. 50 % zu beobachten. Somit ist außer bei dem über Phagozytose aufgenommenem Stimulus Zymosan kein phagozytoseblockierender Effekt der CytD-Vorinkubation zu beobachten.

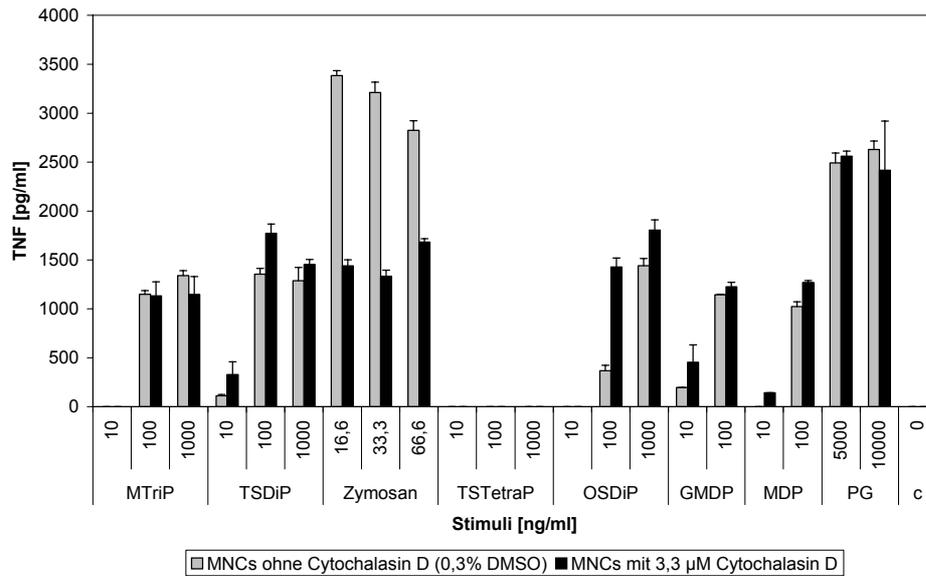


Abbildung 35: Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 4 h stimulierter und für 30 min mit 3 μ M CytD vorinkubierter MNCs mittels ELISA

Vorinkubation mit 100 mM Monodansylcadalverin (MDC)

Die mit 100 mM MDC vorinkubierten Monozyten weisen ebenfalls eine allgemeine Reduktion der TNF- α -Ausschüttung nach Stimulation mit synthetischen Peptidoglykanstrukturen auf (Abbildung 36). Diese Reduktion ist unabhängig vom Stimulus zu beobachten und führt zu einer mehr als 50 %igen Herabsetzung der im ELISA messbaren TNF- α -Konzentrationen im Überstand der stimulierten Zellen.

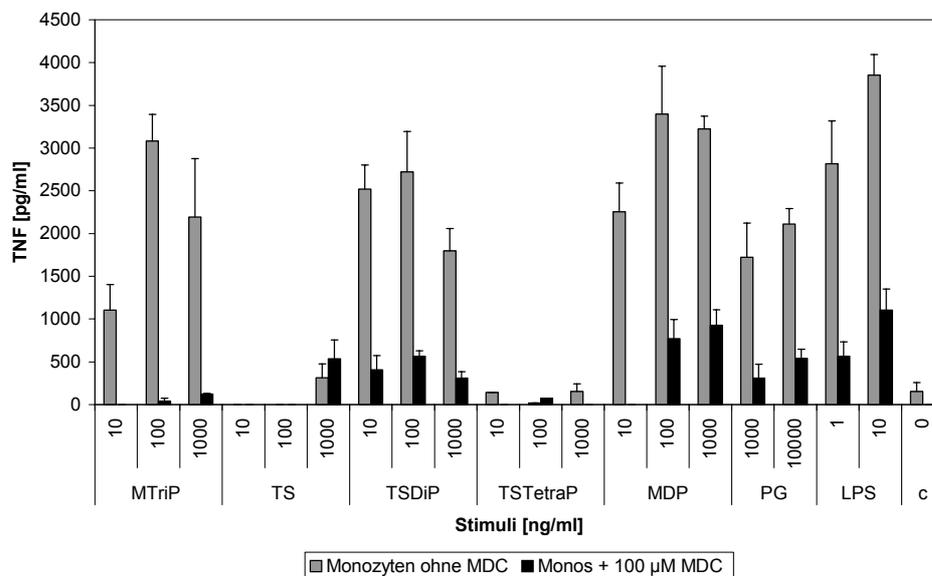


Abbildung 36: Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 4 h stimulierter und für 30 min mit 100 μ M MDC vorinkubierter Monozyten mittels ELISA

Vorinkubation mit 0,1 % Azid

In Abbildung 37 ist eine allgemeine und Stimulus-unabhängige Reduktion der messbaren TNF- α Mengen im Überstand stimulierter Monozyten nach Vorinkubation mit 0,1 % Azid zu beobachten.

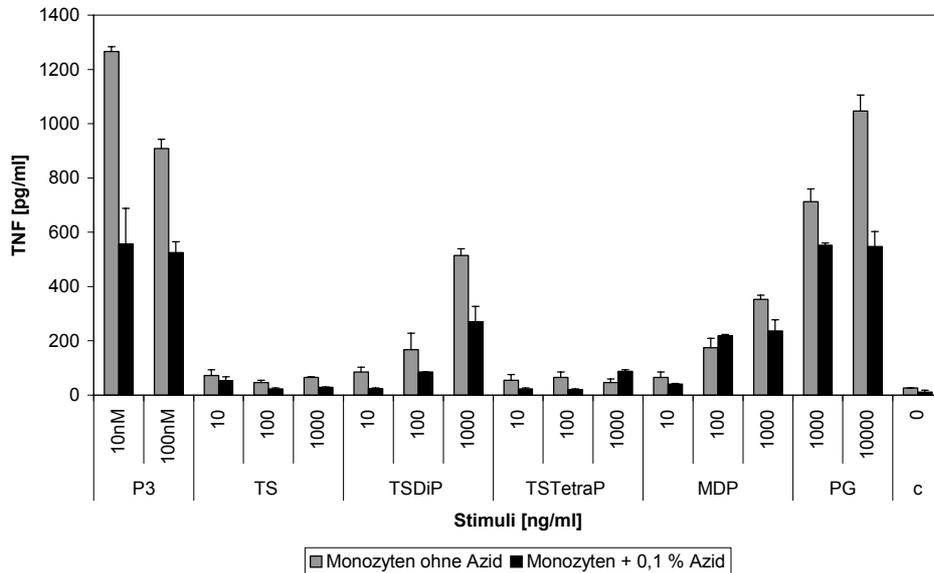


Abbildung 37: Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 4 h stimulierter und für 30 min mit 0,1 % Azid vorinkubierter Monozyten mittels ELISA

Vorinkubation mit 1 μ M 5-(N-ethyl-N-isopropyl)Amilorid (EIPA)

Die mit 1 μ M EIPA vorinkubierten und anschließend mit synthetischen Peptidoglykanstrukturen stimulierten Monozyten zeigen keine Reduktion in der TNF- α -Ausschüttung (Abbildung 38). Auch bei Einsatz steigender Mengen des Makropinozytosehemmers EIPA konnte ein reduzierender Effekt nicht beobachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

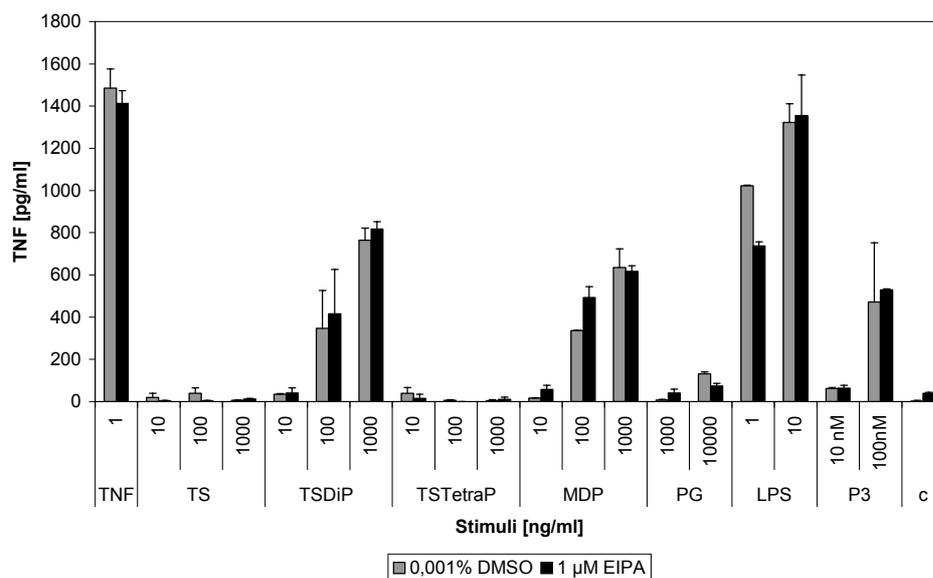


Abbildung 38: Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 4 h stimulierter und für 30 min mit 1 μ M EIPA vorinkubierter Monozyten mittels ELISA

3.13.5 Phosphorylierung von MAP-Kinasen

Um den Effekt von CytD und EIPA auf die Phosphorylierung von MAP-Kinasen untersuchen zu können, wurden Zelllysate von Monozyten im Westernblot untersucht, die vor der Stimulation mit 100 ng/ml TSDiP und MDP und 10 ng/ml LPS für 30 min mit 3 μ M CytD und 1 μ M EIPA inkubiert wurden. In Abbildung 39 wurde die Phosphorylierung von ERK, p38 und JNK untersucht. Als Protein-Beladungskontrolle wurde das unphosphorylierte, konstitutiv exprimierte ERK-Protein nachgewiesen.

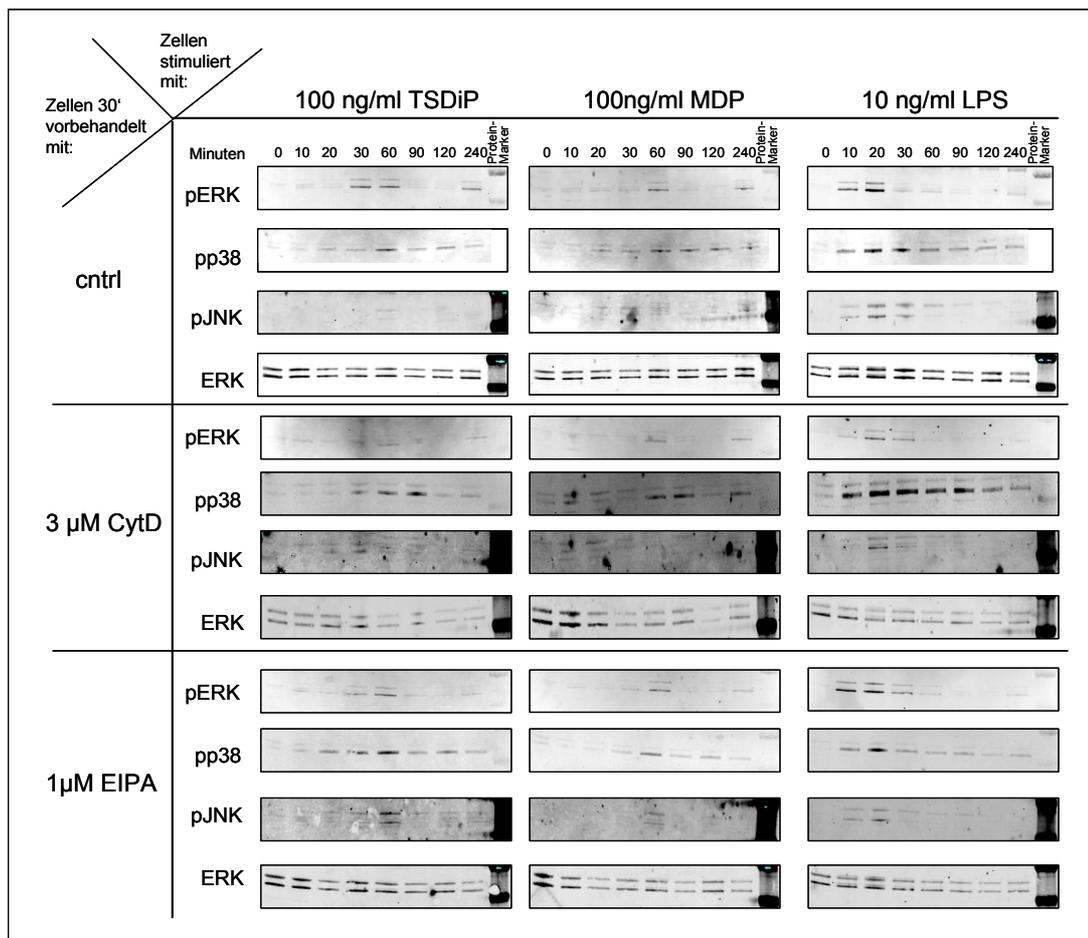


Abbildung 39: Nachweis der ERK-, p38- und JNK-Phosphorylierung zu den Zeitpunkten 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 und 240 min nach Stimulation von Monozyten mit je 100 ng/ml MDP und TSDiP sowie 10 ng/ml LPS. Die Monozyten wurden vor der Stimulation mit 3 μ M der phagozytosehemmenden Substanzen Cyt D und 1 μ M der makropinozytosehemmenden Substanz EIPA für 30 min vorinkubiert

Wie bereits in Abbildung 31 gezeigt werden konnte, ist eine im Vergleich zu der LPS-induzierten Phosphorylierung der MAP-Kinasen verzögerte Aktivierung von ERK, p38 und JNK bei TSDiP- und MDP-stimulierten Monozyten zu beobachten. Die maximale Phosphorylierung von ERK tritt bei den mit TSDiP und MDP stimulierten Monozyten ca. 40 min später als bei den mit LPS stimulierten Zellen auf. Ebenso verhält es sich mit der Aktivierung von p38. Diese hat nach 20-minütiger LPS-Stimulation ihr Maximum erreicht, die mit TSDiP und MDP stimulierten Zellen hingegen weisen nach 60 min Stimulation die stärkste Phosphorylierung auf. Wurden die Zellen vor Stimulation 30 min mit CytD oder EIPA behandelt, so ist nach einer LPS-Stimulation keine Beeinflussung der MAP-Kinasen Phosphorylierung zu beobachten. Die maximale Phosphorylierung von ERK, p38 und JNK bei den mit CytD und

EIPA vorbehandelten Zellen ist zu denselben Zeitpunkten zu beobachten wie bei den mit DMSO behandelten Zellen (Kontrollansatz). Die mit TSDiP und MDP stimulierten Zellen weisen ebenfalls keinen Einfluss der phagozytosehemmenden bzw. makropinozytosehemmenden Substanzen CytD bzw. EIPA auf die Phosphorylierung der MAP-Kinasen auf. Die Aktivierung von ERK, p38 und JNK tritt wie bei den unbehandelten Zellen nach ca. 60 min auf. Daher kann ein Einfluss der Substanzen CytD und EIPA auf die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ausgeschlossen werden.

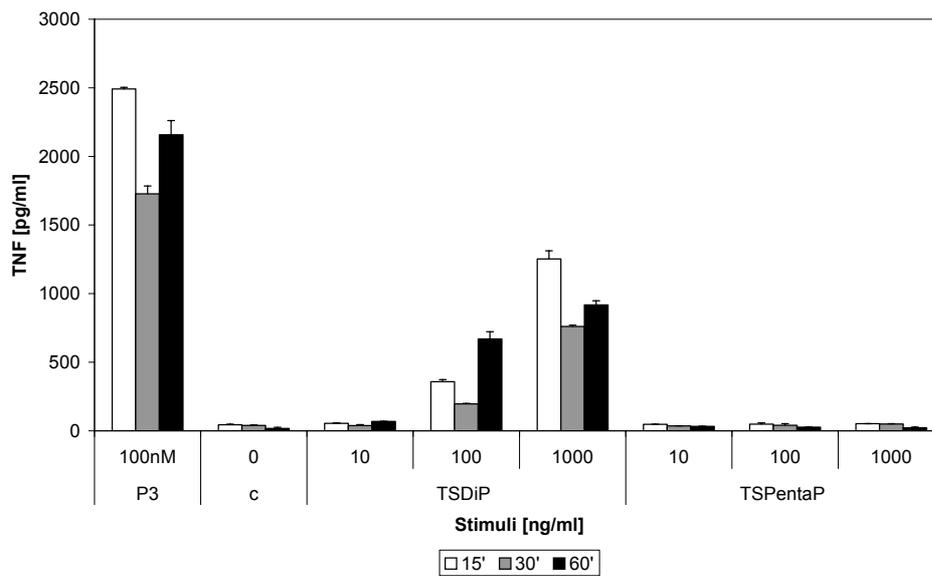
3.14 Expositions kinetik synthetischer Peptidoglykanstrukturen

Da kein Effekt der phagozytosehemmenden und makropinozytosehemmenden Substanzen CytD und EIPA auf die Phosphorylierung der MAP-Kinasen nachgewiesen werden konnte, sollte anhand einer Stimulationskinetik geklärt werden, ob die Substanzen eventuell über einen anderen Weg in die Zelle gelangen. Dazu sollte untersucht werden, wie lange humane Monozyten einem Stimulus ausgesetzt sein müssen, um das durch die Erkennung des Stimulus induzierte Signal zur TNF- α Ausschüttung weiterzuleiten.

Es wurden humanen Monozyten über Zeitspannen von 15', 30' und 60' min mit 10, 100 und 1000 ng/ml TSDiP und TSTetraP sowie 100 nM Pam3CSK4 inkubiert, anschließend in warmen Medium gewaschen und mit frischem Medium bis zu 4 Stunden weiterinkubiert. Anschließend wurde im Überstand die Menge des freigesetzten TNF- α im ELISA gemessen. Wie in Abbildung 40 A) zu erkennen ist, konnten in den Überständen der 15, 30 und 60 min stimulierten Zellen ähnliche Mengen freigesetztes TNF- α detektiert werden. Eine Stimulationszeit von 15 min induziert demnach eine vergleichbare TNF- α Ausschüttung, wie sie nach 30 oder 60 min Stimulation hervorgerufen wird.

Um zu überprüfen, ob kürzere Stimulationszeiten als die in Abbildung 40 A) gezeigten ebenfalls zu einer Ausschüttung von TNF- α führen, wurden humane Monozyten wie oben beschrieben behandelt. Die Stimulationszeiten betragen hierbei allerdings 5, 10 und 15 min. In Abbildung 40 B) ist zu erkennen, dass eine Stimulationszeit von 5 min bereits ausreicht, um die TNF- α Ausschüttung zu induzieren. Demnach wird der Stimulus TSDiP über einen unbekanntem Mechanismus innerhalb der ersten 5 min in die Zelle eingeschleust bzw. Pam3CSK4 des Kontrollansatzes über TLR2 erkannt. Nachfolgend müssen aber 4 h vergehen, bis eine Freisetzung von TNF- α zu beobachten ist (siehe Abbildung 28).

A)



B)

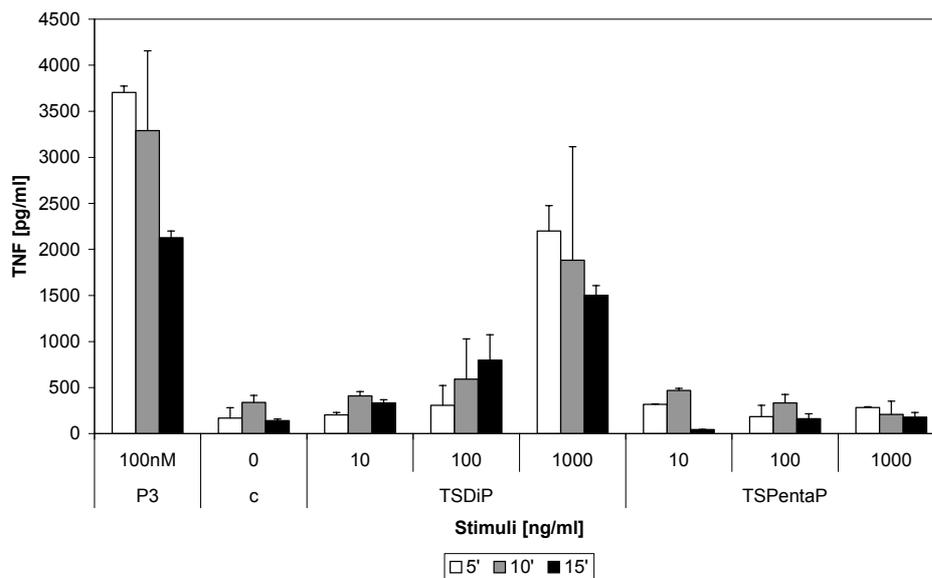


Abbildung 40: ELISA-Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 15, 30 und 60 min (A) und 5, 10 und 15 min (B)) stimulierter Monozyten und anschließender Weiterinkubation mit purem Medium für bis zu 4 h

3.15 Lokalisation von NOD2

3.15.1 Lokalisation in Monozyten

Über die Lokalisation von NOD2 in humanen Monozyten ist wenig bekannt. Ein Nachweis der zytoplasmatischen Lokalisation von NOD2 ist bis jetzt nicht erbracht worden. Um die NOD2-Lokalisation in Monozyten visualisieren zu können, wurden immunhistochemische Färbungen von NOD2, CD14 und Nukleinsäuren durchgeführt. Mit fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern konnte die Hybridisierung der primären Antikörper an das jeweilige Antigen sichtbar gemacht werden. Die

Detektion der fluoreszierenden Signale erfolgte im konfokalen Laserscanningmikroskop unter Einsatz von Lasern verschiedener Wellenlängen.

In Abbildung 41 ist zu erkennen, dass NOD2 im Zytoplasma vorzugsweise in der Kernbucht lokalisiert ist. CD14 ist als rotes Signal auf der Zellmembran lokalisiert und weist keine Kolokalisation mit NOD2 auf. Die blau gefärbten Nukleinsäuren detektieren den Zellkern. Die partielle Kolokalisation der NOD2-Proteine und der Nukleinsäuren sind basierend auf Isotypkontrollen (Daten nicht gezeigt) auf unspezifische Bindungen des NOD2-Antikörpers zurückzuführen.

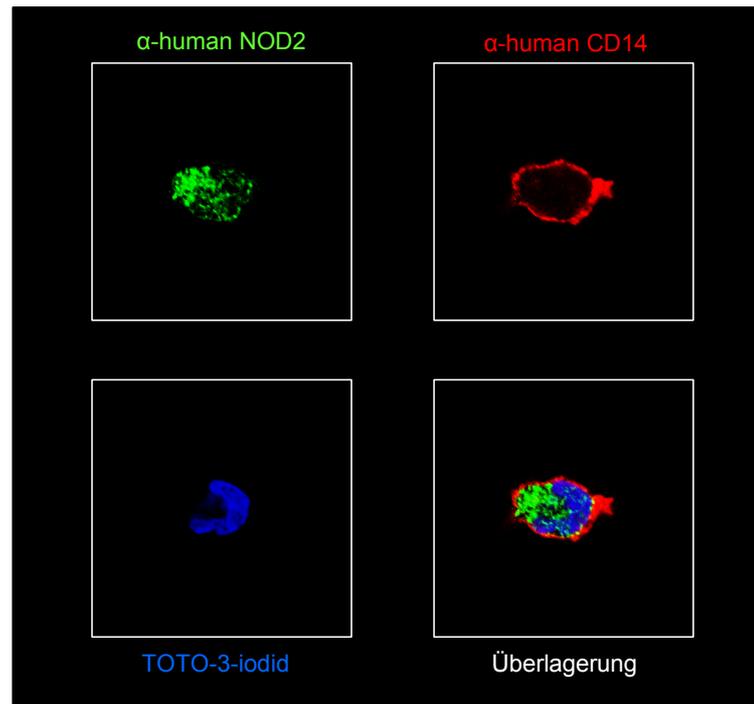


Abbildung 41: Lokalisation von NOD2 (grün), CD14 (rot) und Nukleinsäuren (blau) in Monozyten mittels immunhistochemischer Färbungen und anschließender Detektion im konfokalen Laserscanningmikroskop

Kolokalisation mit Lysosomen

Die Fragen nach der Lokalisation von NOD2 und nach der Aufnahme der aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen ergaben weitere zu untersuchende Aspekte. Es sollte geklärt werden, ob NOD2 eventuell mit Lysosomen kolokalisiert, welche gegebenenfalls die aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen in die Zelle transportieren. Hierzu wurden die Lysosomen stimulierter und unstimulierter humaner Monozyten mithilfe des LysoTrackers detektiert. Parallel wurden NOD2 und die Nukleinsäuren immunhistochemisch angefärbt und die Fluoreszenzsignale der fixierten Zellen im konfokalen Laserscanningmikroskop analysiert.

Das rote Signal des LysoTrackers ist in Form der runden Lysosomen zu erkennen (Abbildung 42). Eine Kolokalisation der Lysosomen mit NOD2 lässt sich nicht feststellen. Die Nukleinsäuren sind als blaues Signal deutlich in Form des Zellkerns zu erkennen und weisen weder eine Kolokalisation mit den rotgefärbten Lysosomen noch mit NOD2-Proteinen auf. Ein Unterschied in der Lokalisation von

NOD2 und den Lysosomen in unstimulierten und mit TSDiP stimulierten Monozyten konnte nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

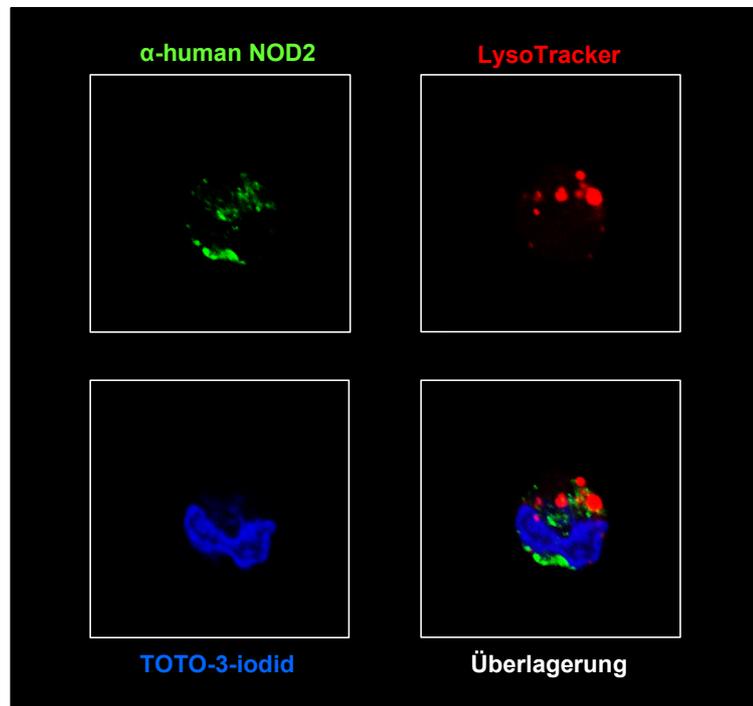


Abbildung 42: Immunhistochemischer Nachweis von NOD2 (grün), Lysosomen (rot) und Nukleinsäuren (blau) in Monozyten im konfokalen Laserscanningmikroskop

Kolokalisation mit Endoplasmatischem Retikulum (ER) und Golgiapparat

Da NOD2 in humanen Monozyten vornehmlich in der Kernbucht nachzuweisen ist, sollte untersucht werden, ob NOD2 mit dem dort lokalisierten Endoplasmatischem Retikulum (ER) und/oder dem Golgiapparat kolokalisiert. Eine Färbung humaner Monozyten mit einem FITC-gekoppelten α -Calnexin Antikörper machte die Membranen des ER sichtbar (grün). Zusätzlich wurde der Golgiapparat mit einem Fluorochrom-gekoppelten *wheat germ* (Weizenkeim) Agglutinin Antikörper detektiert (blau). Das rote Signal visualisiert die intrazelluläre Lokalisation der NOD2-Proteine.

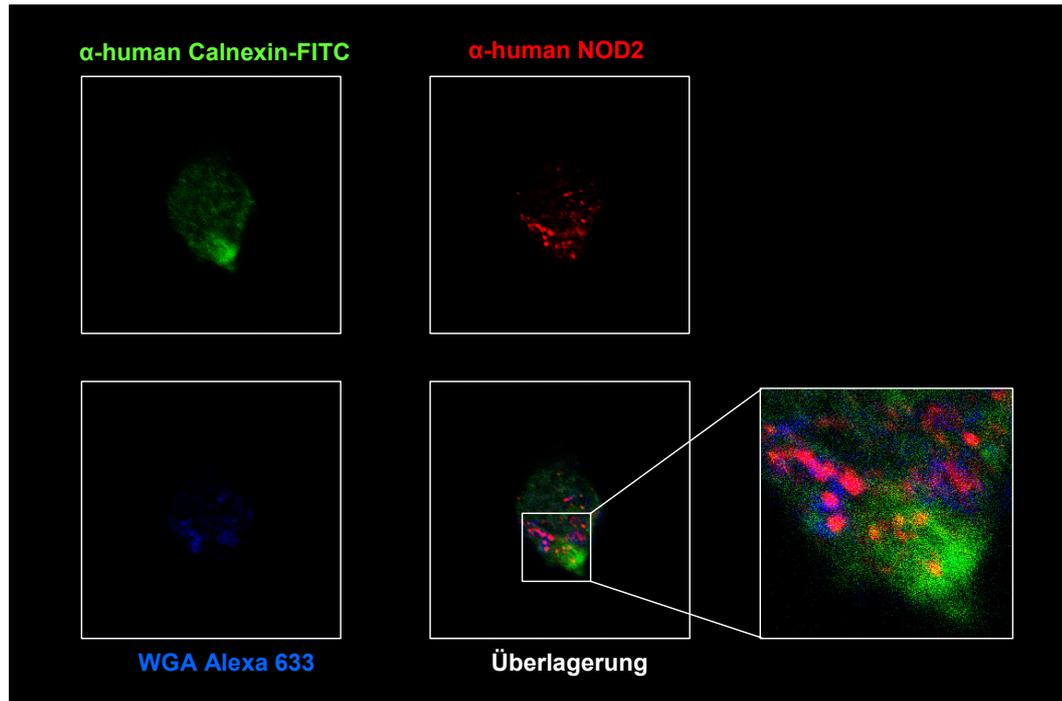


Abbildung 43: Immunhistochemischer Nachweis von ER (grün), NOD2 (rot) und Golgiapparat (blau) in Monozyten im konfokalen Laserscanningmikroskop

In Abbildung 43 ist zu erkennen, dass das grüne Signal des FITC-gekoppelten α -Calnexin Antikörper ebenso wie das blaue Fluoreszenzsignal des wheat germ Agglutinin in der Kernbucht lokalisiert ist. Das rote Signal des NOD2-Proteins ist im Zytoplasma nachzuweisen. Eine Kolo-kalisation der NOD2-Proteine ist partiell mit dem ER zu beobachten, vermehrt tritt eine Assoziation von NOD2 aber mit dem Golgiapparat auf. Einige fluoreszierende NOD2-Signale sind weder mit ER noch mit dem Golgiapparat kolo-kalisiert.

Kolo-kalisation mit RIP2

Inohara *et al.*⁷⁰ konnten anhand von Transfektionsstudien zeigen, dass NOD2 in HEK293-Zellen über die CARD-Domäne mit RIP2 interagiert und dadurch eine Induktion der NF- κ B Translokation hervorruft. Diese Beobachtung sollte anhand von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen verifiziert werden. Dafür wurden humane Monozyten mit 100 ng/ml MDP stimuliert und anschließend immunhistochemisch angefärbt. Der NOD2 Antikörper wurde mit einem rot fluoreszierenden sekundären Antikörper nachgewiesen, RIP2 wurde mit einem grün fluoreszierenden sekundären Antikörper detektiert. Die Nukleinsäuren wurden mit TOTO-3-iodid nachgewiesen.

Wie bereits in Abbildung 41 gezeigt werden konnte, ist auch in dieser fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung (Abbildung 44) NOD2 konzentriert in der Kernbucht zu detektieren. RIP2 hingegen ist zum einen mit der Zellmembran im zytoplasmatischen Bereich assoziiert, und zum anderen kolo-kalisiert das grüne Signal mit dem blauen Signal der Nukleinsäuren im Zellkern. Bei der Überlagerung der drei Fluoreszenzsignale ist eine Kolo-kalisation von NOD2 und RIP2 teilweise im zytoplasmatischen Bereich der Zellmembran und in der Kernbucht zu beobachten (Pfeile).

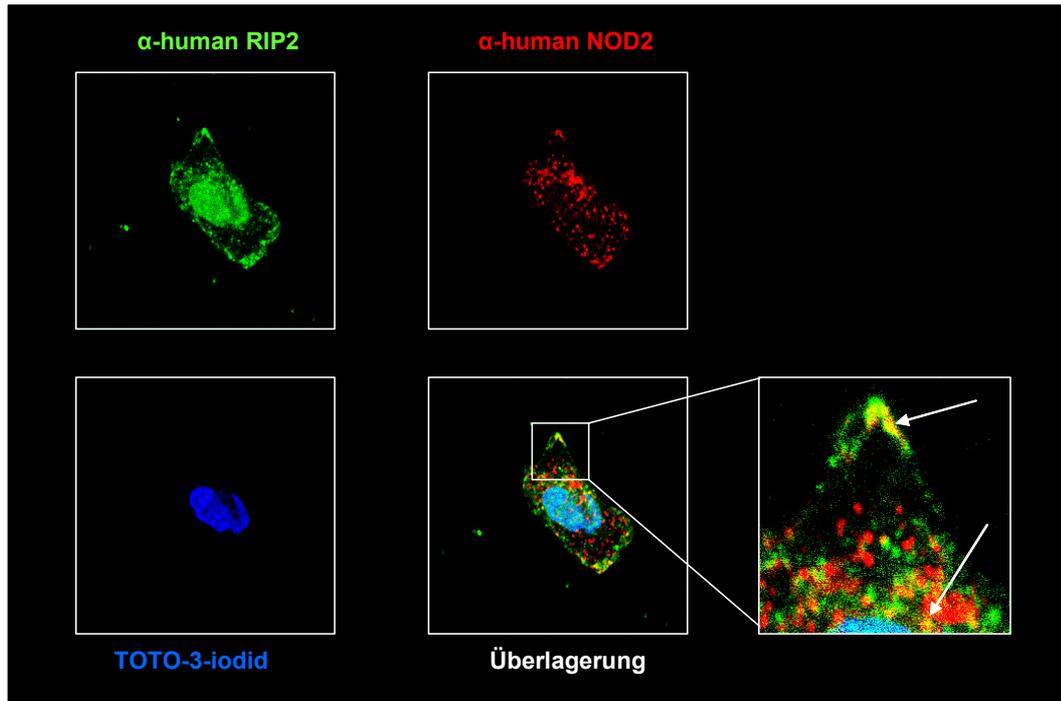


Abbildung 44: Immunhistochemischer Nachweis von RIP2 (grün), NOD2 (rot) und Nucleinsäuren (blau) in Monozyten im konfokalen Laserscanningmikroskop

3.15.2 Lokalisation in HEK293-Zellen

Nachdem die NOD2-CDS wie unter 3.6 beschrieben erfolgreich in den pcDNAdest47 Vektor kloniert wurde, konnten Expressionsstudien und Lokalisationsstudien des NOD2-GFP in transient transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt werden. Erste Untersuchungen wurden zur Lokalisation des NOD2-GFP am konfokalen Laserscanningmikroskop durchgeführt. Hierzu wurden die HEK293-Zellen mit pcDNAdest47-NOD2 transient transfiziert und für 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Die lebenden Zellen wurden direkt am Laserscanningmikroskop untersucht. In Abbildung 45 sind die Ergebnisse aufgeführt.

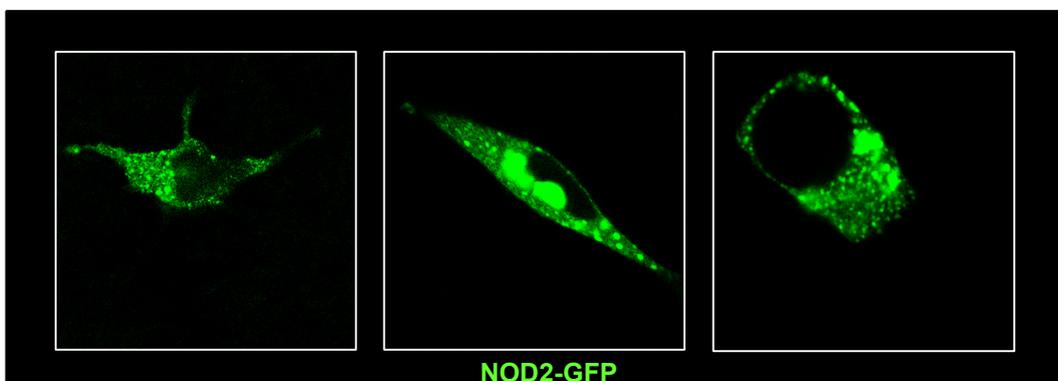


Abbildung 45: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit pcDNAdest47 NOD2 transient transfizierten HEK293-Zellen. Die grünen Signale detektieren die NOD2-GFPs.

Die grünen Fluoreszenzsignale sind deutlich im Zytoplasma zu erkennen. Ein stärkeres Signal des GFP ist in Regionen nahe dem Zellkern detektierbar. Darüber hinaus ist das Signal nicht homogen im Zytoplasma verteilt, sondern lässt sich als kleinere „Fluoreszenzspots“ über die Fläche des Zytoplasmas verteilt erkennen.

Verifizierung des NOD2-GFP Signals

Um zu überprüfen, ob anhand des grünen Fluoreszenzsignals in den mit pcDNAdest47 NOD2 transient transfizierten HEK293-Zellen tatsächlich auf die Lokalisation des NOD2-GFP-Proteins geschlossen werden kann, wurden immunhistochemische Färbungen mit einem NOD2 Antikörper durchgeführt. Ein rot fluoreszierender sekundärer Antikörper wurde zur Detektion der an die NOD2-Antigene gekoppelten NOD2 Antikörper verwendet. Parallel dazu wurden die Nucleinsäuren mit TOTO-3-iodid angefärbt.

In der Überlagerung der Abbildung 46 ist zu erkennen, dass das grüne Fluoreszenzsignal des NOD2-GFP mit dem roten Fluoreszenzsignal des NOD2 Antikörper kolokalisiert. Somit kann auf eine korrekte Erkennung des NOD2 Antikörper von NOD2-GFP geschlossen werden. Der Grund für ein stärkeres rotes Signal des anti-NOD2 Antikörpers ist, dass der α -NOD2 Antikörper nicht nur die NOD2-GFPs sondern auch die nativen, nicht GFP-fusionierten NOD2-Proteine der HEK293-Zellen erkennt.

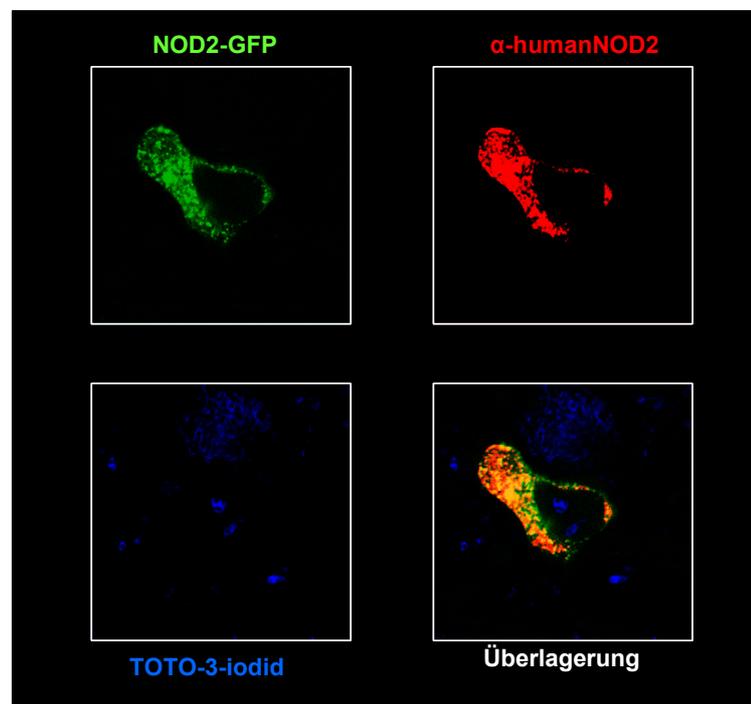


Abbildung 46: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von mit pcDNAdest47 NOD2 transfizierten HEK293-Zellen (NOD2-GFP; grün). Der immunhistochemische Nachweis von NOD2 ist rot dargestellt, die Nucleinsäuren sind blau detektierbar

Kolokalisation mit Lysosomen

Wie bereits in Punkt 3.15.1 bei Monozyten analysiert, wurde eine mögliche Kolokalisation von NOD2 und den Lysosomen in den mit pcDNAdest47 NOD2 transient transfizierten HEK293-Zellen geprüft. Hintergrund hierzu ist ein möglicher Transport der von NOD2 erkannten synthetischen Peptidoglykanstrukturen über die Lysosomen in die Zelle. Die Lysosomen wurden mit dem pH-abhängigen Farbstoff LysoTracker visualisiert, die NOD2-Proteine konnten dank des fusionierten GFPs direkt in lebenden Zellen detektiert werden.

In Abbildung 47 ist, wie bereits unter Punkt 3.15.2 beschrieben, eine Lokalisation des NOD2-GFP-Signals in der Kernbucht zu beobachten. Eine Kolokalisation des grünen GFP-Signals und der rot fluoreszierenden Lysosomen konnte partiell nachgewiesen werden (Pfeil).

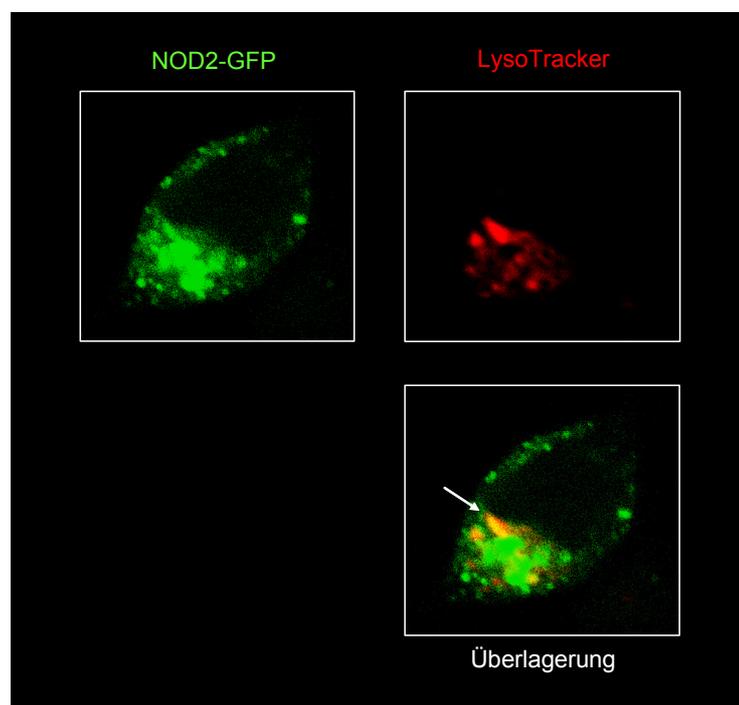


Abbildung 47: Immunhistochemischer Nachweis von NOD2 (grün) und Lysosomen (rot) in lebenden mit pcDNAdest47 NOD2 transfizierten HEK293-Zellen im konfokalen Laserscanningmikroskop

Kolokalisation mit dem Golgiapparat

Um eine Kolokalisation von NOD2-GFP und dem Golgiapparat in lebenden HEK293-Zellen beobachten zu können, wurde der Golgiapparat mit einem Bodipy TRITC gelabelten C₅-Ceramid angefärbt. Das gelabelte Ceramid gehört zu der Klasse der Sphingolipide, die wichtige Bestandteile von Biomembranen sind. Infolgedessen wurden neben den Membranen des Golgiapparates unter anderem auch die Zellkernmembran und die Zellmembran als unerwünschter Nebeneffekt angefärbt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 48 dargestellt.

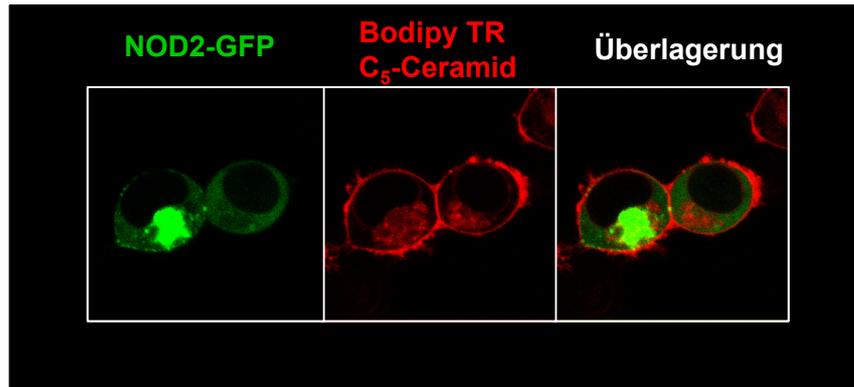


Abbildung 48: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von NOD2-GFP (grün) und mit BODIPY TRITC C₅-Ceramid (rot) gefärbten Membranen (Zellmembran, Zellkernmembran, Golgiapparatsmembran) in mit pcDNAdest47-NOD2 transfizierten HEK293-Zellen

Die rot fluoreszierende Golgiapparatsmembran ist, wie erwartet, in der Kernbucht lokalisiert. Eine Koinzidenz mit dem grün fluoreszierenden NOD2-GFP ist in der Überlagerung gut zu erkennen.

3.16 Kinetik des NOD2-GFP-Signals nach Stimulation

Die Lokalisation von NOD2 in humanen Monozyten und in mit pcDNAdest47-NOD2 transient transfizierten HEK293-Zellen konnte in Abbildung 41 und Abbildung 45 bereits gezeigt werden. Um den Verlauf des NOD2-GFP-Signals in HEK293-Zellen nach Stimulation mit dem aktiven TSDiP beobachten zu können, wurden das GFP Signal NOD2-GFP exprimierender HEK293-Zellen über einen Zeitraum von 90 min mithilfe eines beheizbaren konfokalen Laserscanningmikroskops detektiert. Hierzu wurde alle 15 sec das grün fluoreszierende Signal stimulierter HEK293-Zellen aufgenommen. Die Bilder konnten anschließend hintereinandergeschaltet als Zeitraffer dargestellt werden. In Abbildung 49 sind beispielhaft die Aufnahmen der Zeitpunkte 0, 30, 60 und 75 min dargestellt.

Zum Zeitpunkt 0 der Stimulation ist ein grünes Signal des NOD2-GFPs in den Zellen zu erkennen. Nach einer Stimulationszeit von 30 min hat sich das Signal im Bereich der Kernbucht verstärkt. Darüber hinaus treten im Verlauf der Kinetik weitere grün fluoreszierende „Signalspots“ im Zytoplasma der mit pcDNAdest47-NOD2 transient transfizierten HEK293-Zellen auf. Wird das GFP Signal 60 min nach Stimulationsbeginn beobachtet, so kann eine im Vergleich zur Fluoreszenz des GFPs nach 30 min Stimulation gesteigerte Fluoreszenz detektiert werden. Weiterhin treten im Verlauf der GFP-Detektion in den bisher GFP-negativen Zellen erste Fluoreszenzsignale auf (Pfeile), die sich nach 75-minütiger Stimulation verstärkt haben. Auch das Fluoreszenzsignal in der Kernbucht ist nach 75 min Stimulation deutlich stärker als im Vergleich zum Zeitpunkt 0 der Stimulation. In unstimulierten Monozyten sieht man dagegen über einen Zeitraum von 90 min kaum eine Zunahme des Fluoreszenzsignals ((Daten nicht gezeigt).

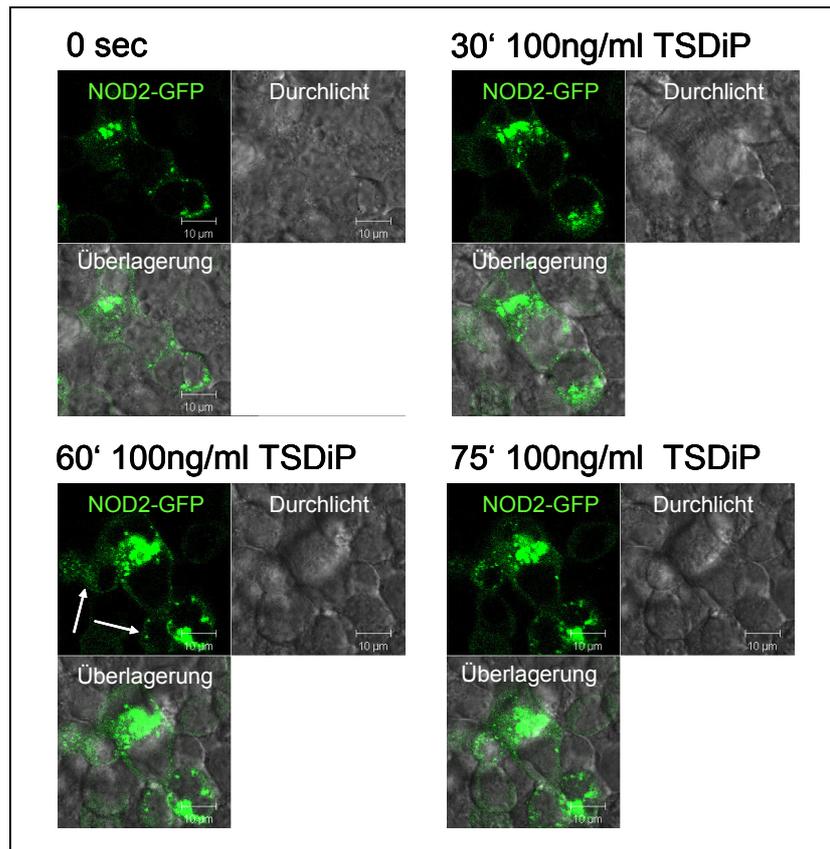


Abbildung 49: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von NOD2-GFP (grün) in mit pcDNAdest47 NOD2 transfizierten HEK293-Zellen zu den Zeitpunkten 0, 30, 60 und 75 min nach Stimulation mit 100 ng/ml TSDiP

3.17 Array-Analyse

Wie in Punkt 3.1.1 bereits gezeigt werden konnte, werden humane Monozyten durch das aktive TSDiP zur TNF- α -Ausschüttung angeregt. Darüber hinaus konnte mithilfe transient transfizierter HEK293-Zellen bewiesen werden, dass das aktive TSDiP über NOD2 die HEK293-Zellen zur IL-8-Freisetzung induziert. Um Unterschiede zwischen der von TSDiP über NOD2 induzierten Entzündungsantwort und der durch Pam3CSK4 über TLR2 vermittelten Inflammation in Monozyten auf Genebene untersuchen zu können, wurden mRNA-Array-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden Gen-Arrays mit 96 humanen Genen inflammatorischer Zytokine und deren Rezeptoren verwendet. Die für die Array-Analyse eingesetzte cDNA wurde aus mRNA von i) mit 100 ng/ml TSDiP für 4 Stunden stimulierten humanen Monozyten, ii) mit 100 nM Pam3CSK4 für 4 Stunden stimulierten Monozyten und mit mRNA aus iii) unstimulierten Monozyten hergestellt. Hierbei sollten besonders die Unterschiede in der Genexpression zwischen TSDiP-stimulierter und Pam3CSK4-stimulierter Monozyten im Vordergrund stehen.

Vergleich der Genexpression von unstimulierten und stimulierten Monozyten

In Abbildung 50 sind sowohl die Arrays der unstimulierten Monozyten und der mit Pam3CSK4 stimulierten Monozyten als auch die x-fache Induktion der ansteigenden und absteigenden Genexpression dargestellt. Exemplarisch sind die Spots der stärksten ansteigenden und stärksten absteigenden Genexpressionen nach Stimulation mit Pam3CSK4 im Vergleich zu den unstimulierten Monozyten markiert. So ist zu erkennen, dass nach Stimulation mit Pam3CSK4 der Spot für das Gen IL-6 stärker erscheint als bei unstimulierten Monozyten und dass der bei den unstimulierten Monozyten erkennbare Spot für das Gen Eotaxin 2 nach Stimulation mit Pam3CSK4 verschwindet.

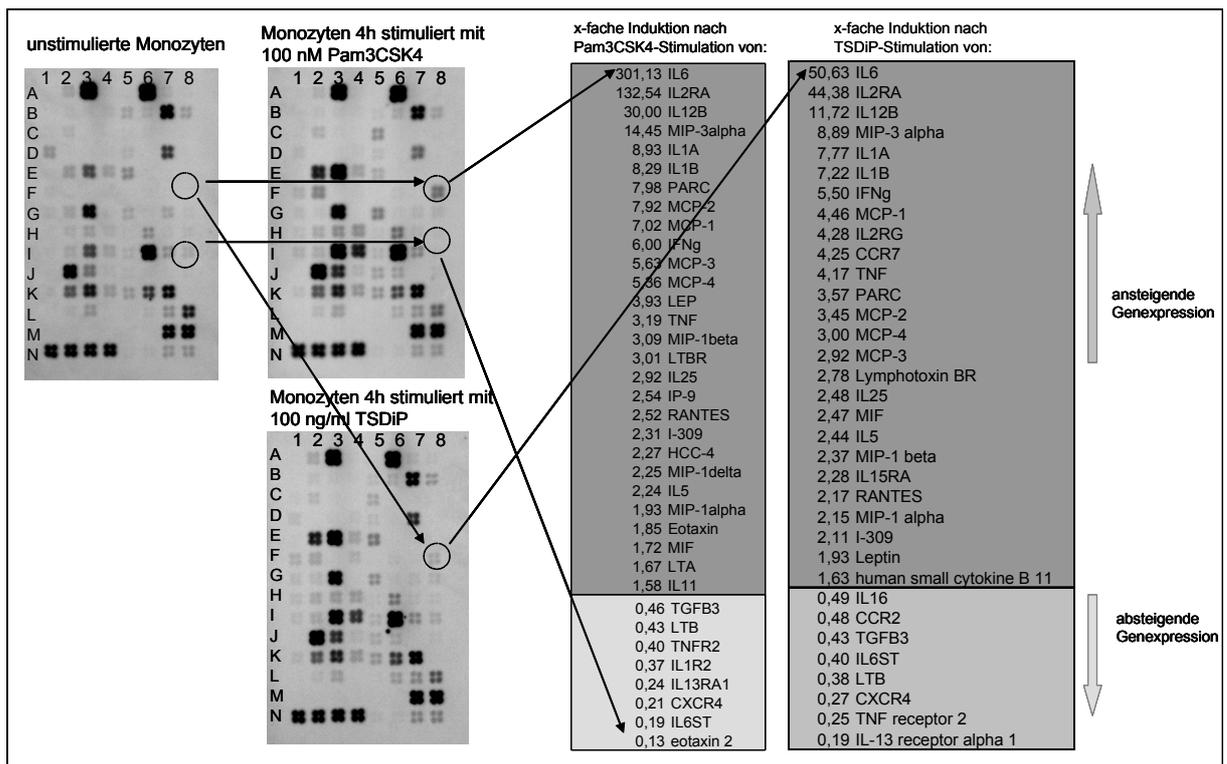


Abbildung 50: mRNA-Arrays unstimulierter und mit 100 nM Pam3CSK4 für 4 h stimulierter Monozyten cDNA. Die x-fache Induktion der ansteigenden und absteigenden Genexpressionen nach Stimulation mit Pam3CSK4 sind tabellarisch dargestellt. Die am stärksten positiv und negativ regulierten Gene sind exemplarisch markiert

Verifizierung der Arraydaten mittels ELISA

Die Überstände der für die mRNA-Arrays verwendeten Zellen wurden parallel zur Genebene auf das Vorhandensein von IL-8, TNF- α , IL-6 und IL-1 β als Protein untersucht. Diese Untersuchungen dienen zur Verifizierung der mithilfe der Arrays getroffenen Aussagen. In Abbildung 51 A), B) und C) sind die Ergebnisse der TNF- α -, IL-6- und IL-1 β -ELISAs aufgeführt.

Eine Freisetzung von TNF- α kann nach einer Stimulation der Monozyten mit TSDiP und Pam3CSK4 ebenfalls beobachtet werden. Hierbei induziert Pam3CSK4 eine Freisetzung größerer Mengen TNF- α als TSDiP (Abbildung 51 A)). 3,5 ng/ml TNF- α waren durch die Stimulation mit Pam3CSK4 im Vergleich zu 1 ng/ml TNF- α nach Stimulation mit TSDiP im Medium messbar. Dieser Effekt ist auch bei den Proteinen IL-6 und IL-1 β zu beobachten (Abbildung 51 B) und C)): Beide Stimuli regen die Monozyten zur Ausschüttung von IL-6 und IL-1 β an, wobei 100 nM Pam3CSK4 ausreichen, um eine im

Vergleich zu TSDiP höhere Menge IL-6 bzw. IL-1 β zu induzieren. Diese Ergebnisse korrelieren deutlich mit denen der Arrays, in denen eine IL-6, TNF- α und IL-1 β Induktion auf Genebene nach Stimulation mit TSDiP bzw. Pam3CSK4 klar zu detektieren ist.

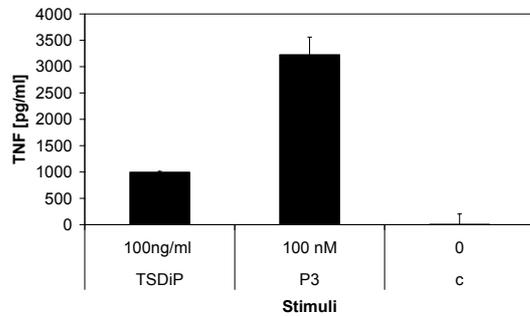
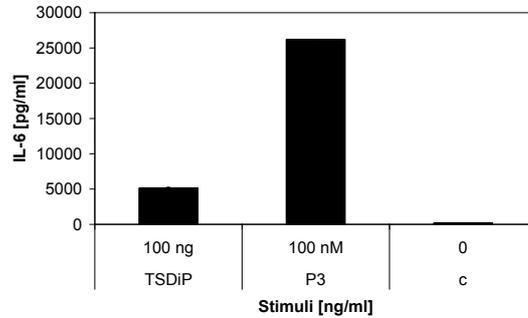
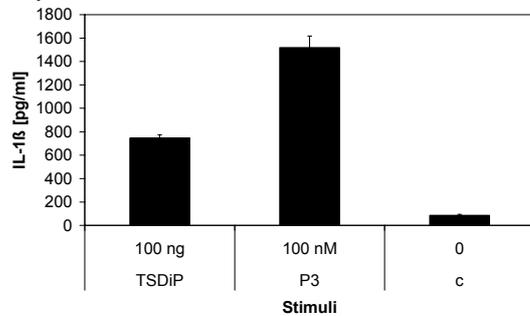
A) TNF- α -ELISA**B) IL-6-ELISA****C) IL-1 β -ELISA**

Abbildung 51: TNF- α - (A), IL-6- (B) und IL-1 β -ELISAs (C) der Überstände der für die mRNA-Arrays verwendeten Monozyten

4 Diskussion

Seit 1997 von Medzhitov *et al.*¹⁴ der erste humane Toll-like Rezeptor (TLR) als wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort identifiziert worden ist, wurde die Forschung auf dem Gebiet der Erkennung pathogener Muster durch das angeborene Immunsystem stark intensiviert. Die Entdeckung der von Janeway *et al.*⁷¹ als *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) bezeichneten TLRs und die dadurch ausgelöste Welle an Forschungsarbeiten sorgte für die Identifizierung von bis heute 11 TLRs im humanen System. Die damit einhergehende Identifizierung der spezifischen TLR-Liganden zeigte im Verlauf der letzten 9 Jahre, dass es sich bei allen Agonisten um hochkonservierte bakterielle Virulenzfaktoren handelt, den sogenannten *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs). Zu ihnen zählen unter anderem Lipopolysaccharid (LPS) als Teil der Gram-negativen Zellmembran, Flagellin als Protein der bakteriellen Flagellen, die der Beweglichkeit dienen, oder die in der Zellwand verankerten Lipopeptide und Lipoteichonsäuren (*Lipo Teichoic Acids*, LTA). Als von Inohara *et al.*⁷² und Girardin *et al.*⁵⁹ die Familie der NOD-Proteine als intrazelluläre Sensoren für bakterielle Zellwandbestandteile entdeckt wurde, wurde deutlich, dass neben dem breiten Spektrum extrazellulärer Rezeptoren eine ähnlich große Gruppe intrazellulärer Rezeptoren existiert und dass die spezifischen PAMPs als Liganden der PRRs als Ansatzpunkte für medikamentöse Therapien bakteriell bedingter Krankheiten von großer Bedeutung für die zukünftige klinische Forschung sein werden.

Um fundierte Aussagen über die genauen Erkennungsmechanismen von PAMPs durch PRRs und die dadurch aktivierten Signalwege treffen zu können, wurden für die Untersuchungen dieser Vorgänge reine Präparationen der PAMPs verwendet. Geringste Verunreinigungen der PAMP-Präparationen mit anderen bakteriellen Virulenzfaktoren führten leicht zu Fehlinterpretationen über die Spezifität von PRRs. Kirschning *et al.*⁶² und Yang *et al.*⁶³ beschrieben z. B. kurz nach der Entdeckung der TLRs zuerst TLR2 als Rezeptor für Endotoxin bzw. bakterielles Lipopolysaccharid, und auch Inohara *et al.*⁴⁵ beschrieben irrtümlich LPS als Ligand für NOD1 und NOD2. Travassos *et al.*²² konnten schließlich 2004 aufdecken, dass PG nicht der spezifische Ligand für TLR2 ist. In der vorliegenden Arbeit wurde an dieser Stelle angesetzt und mithilfe synthetisch hergestellter und reiner Peptidoglykanstrukturen die Immunreaktionen humaner Immunzellen untersucht. Von großem Interesse dabei waren die Strukturanforderungen als ausschlaggebender Punkt in der Erkennung dieser synthetischen Peptidoglykanstrukturen sowie die in den Erkennungsprozess involvierten Mechanismen und Rezeptoren. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die intrazellulären NOD-Proteine gelegt.

Inflammatorische Aktivität synthetischer Peptidoglykanstrukturen

Girardin *et al.*⁴⁶ konnten zeigen, dass das im Peptidoglykan Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien vorkommende Molekül Muramyldipeptid (MDP), bestehend aus der Saccharideinheit N-acetyl-Muramylsäure (MurNAc) und den Aminosäuren L-Alanin und D-Isoglycin, in Zellen eine NF- κ B-Aktivierung mit anschließender Transkription von Entzündungsgenen induziert. Dies korreliert mit den Beobachtungen dieser Arbeit, dass nur die synthetischen Peptidoglykanstrukturen mit einer Peptidkette aus mindestens zwei (bestehend aus L-Alanin und D-Isoglycin) und maximal drei Aminosäuren (bestehend aus L-Alanin, D-Isoglycin und L-Lysin) in humanen mononukleären Zellen und humanen Monozyten inflammatorisch aktiv sind und nach 4-stündiger Exposition in diesen Immunzellen eine

TNF- α -Freisetzung induzieren (Abbildungen 11 und 12). Die Anzahl der Saccharideinheiten spielt hierbei keine Rolle. Somit kann das Molekül MDP mit seinen zwei Zuckermolekülen und den beiden Aminosäuren L-Alanin und D-Isoglycin als minimale, aus bakteriellen Zellwandbestandteilen isolierte inflammatorisch aktive Struktur angesehen werden^{46,48-50}. Saccharidmoleküle mit Peptidketten aus vier bis fünf Aminosäuren induzieren in humanen MNCs und humanen Monozyten hingegen kein inflammatorisches Signal in Form von TNF- α . Daraus geht hervor, dass humane Immunzellen kein Enzymrepertoire besitzen, um aus Saccharideinheiten mit Seitenketten bestehend aus vier bis fünf Aminosäuren aktive Strukturen mit zwei bis drei Aminosäureseitenketten zu generieren. Darüber hinaus konnten Moreillon *et al.*⁷³ mit Peptidoglykanfragmenten von *Staphylococcus aureus* zeigen, dass lange lösliche Peptidoglykanfragmente mit einem Molekulargewicht von über 100 kDa kaum eine Entzündungsreaktion in Immunzellen auslösen. Wurden diese Peptidoglykanketten hydrolytisch in ihre minimale Einheit bestehend aus zwei Zuckern (N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) und N-Acetylglucosaminsäure (GlcNAc)) und einer Aminosäure (L-Alanin) gespalten, so verloren diese ihre immunstimulatorische Eigenschaft komplett. Ein durch einen enzymatischen Verdau der Staphylokokken-Zellwand generierte Mischung aus inflammatorisch hochaktiven Fragmenten, bestehend aus Saccharidtripeptiden und inaktiven Fragmenten, wie Monomeren und Aggregaten, lieferte schließlich den Hinweis, dass die aktiven Strukturen des Peptidoglykans mindestens zwei Aminosäuren beinhalten müssen⁷⁴.

Das in der vorliegenden Arbeit als Positivkontrolle für die Stimulierbarkeit von Monozyten verwendete lösliche Peptidoglykan, eine Präparation aus dem Gram-positiven Bakterium *Staphylococcus aureus*, die aus Fragmenten mit einer undefinierten Anzahl Saccharidmolekülen und einer unbekannt Menge Aminosäuren in den Peptidseitenketten besteht, induziert ebenfalls eine Freisetzung von TNF- α in humanen mononukleären Zellen und Monozyten (Abbildung 12). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass in den verwendeten löslichen Fraktionen von Peptidoglykan entweder Fragmente mit Peptidseitenketten von zwei bis drei Aminosäuren vorhanden sind⁷⁴ oder ganz andere Strukturen, wie z. B. Kontaminationen mit Lipopeptiden, eine inflammatorische Aktivierung ausgelöst haben. Diese aktiven Peptidoglykanstrukturen entstehen zum einen im Zuge der Remodulierung der Bakterienzellwand, wie es bei der Zellteilung geschieht, und zum anderen nach hydrolytischer Spaltung des Peptidoglykans durch bakterielle Enzyme, welche sich in vier Klassen aufteilen lassen⁷⁵⁻⁷⁷⁴⁴. Eine Klasse beinhaltet die Muramidase, die das alternierende Zuckerrückgrat des Peptidoglykans zwischen den Zuckern MurNAc und GlcNAc hydrolysiert. Die zweite Klasse bilden die Glucosamidasen, welche die durch die Muramidasen entstandenen Disaccharide in Monosaccharide spalten. Die Amidasen katalysieren die Abspaltung der ersten Aminosäure vom MurNAc, während die Endopeptidasen die Aminosäureketten untereinander spalten. Aber auch Wirtsenzyme können Peptidoglykan spalten. So hat das Lysozym, wie es in Schleimhäuten und sekretorischen Flüssigkeiten vorkommt, Muramidase-Eigenschaften und kann dadurch bakterielle Pathogene effektiv bekämpfen⁴⁴. Die durch enzymatische Spaltung entstandenen Peptidoglykanstrukturen werden von Immunzellen des angeborenen Immunsystems erkannt und veranlassen diese zur Induktion einer Signalkaskade mit anschließender Freisetzung von TNF- α . Aus den oben genannten Beobachtungen kann geschlossen werden, dass synthetische Peptidoglykanstrukturen mit mindestens zwei und maximal drei Aminosäuren in der

Peptidseitenkette und einer Anzahl von ein bis acht Saccharideinheiten als Bestandteil der Zellwand Gram-positiver Bakterien als entzündungsauslösende PAMPs anzusehen sind.

Bei mononukleären Zellen ist eine Mindestkonzentration der aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen von 100 ng/ml erforderlich, um eine Induktion von TNF- α zu erzielen. Monozyten hingegen werden schon bei einer Stimulation mit 10 ng/ml der aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen zur Ausschüttung von TNF- α angeregt. Die Beobachtung, dass bei MNCs eine höhere Dosis Stimulus erforderlich ist als bei Monozyten, lässt sich durch das Vorhandensein anderer Immunzellen wie beispielsweise T- und B-Zellen in der Fraktion der mononukleären Zellen erklären. Dadurch ist der Anteil der TNF- α -produzierenden Monozyten in den MNCs geringer als im Vergleich zu einer reinen Monozytenpopulation, was sich wiederum in den von Monozyten freigesetzten Mengen des Zytokins bemerkbar macht. Bemerkenswert ist hierbei allerdings, dass für die Induktion der TNF- α -Freisetzung in MNCs und in Monozyten eine Zugabe des Stimulus in das Medium der Kultur genügt. Andere Untersuchungen zeigen, dass eine Freisetzung inflammatorischer Zytokine erst nach einer Mikroinjektion bzw. Transfektion des Stimulus in die Zelle beobachtet werden konnte^{45;46;48;78;79}.

Girardin *et al.* konnte beispielsweise keine NF- κ B Translokation in Makrophagen und mit NOD2 transfizierten HEK293-Zellen nach Zugabe von 100 ng/ml des NOD2-Stimulus MDP in die Kultur beobachten⁴⁶. Für die Mikroinjektion bzw. Transfektion des Stimulus in die Zelle wurden Mengen von 100 ng/ml benötigt, um eine Aktivierung der Zellen beobachten zu können. Aus eigenen Untersuchungen geht hervor, dass für eine inflammatorische Aktivierung der zuvor mit für die entsprechenden Rezeptoren kodierenden Plasmide transient transfizierten HEK293-Zellen eine Zugabe des Stimulus zum Medium für 18 h ausreicht, um eine IL-8-Freisetzung zu induzieren (Abbildung 16). Nach Mikroinjektion bzw. Transfektion des Stimulus in die Zelle kann nach 4 h eine Aktivierung registriert werden. Die direkte Verfügbarkeit des NOD-Stimulus im Zytoplasma ist vermutlich der Grund für die schnelle Aktivierung der Zelle nach Mikroinjektion bzw. Transfektion, ohne dass der Stimulus, wie bei der Zugabe des Stimulus in das Medium, über bisher unbekannte aktive oder passive Mechanismen in die Zelle gelangen muss. Daraus leitet sich die Fragestellung ab, ob die Aktivierung mit extrazellulären TLR-Liganden mit einer anderen Kinetik erfolgt als die von NOD2-Liganden induzierte. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Kinetik der Stimulation von Monozyten mit synthetischen Peptidoglykanstrukturen untersucht (Abbildung 28).

Die Stimulation der Monozyten über einen Zeitraum von vier Stunden und in zeitlichen Abständen von 60, 90, 120 und 240 min zeigt deutlich, dass Monozyten nach einer Stimulation mit aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen (TSDiP, MTriP, MDP) erst nach 240 min eine Freisetzung von TNF- α induzieren. Werden die Zellen hingegen mit einem Agonisten eines extrazellulären Rezeptors, wie z. B. Pam3CSK4 als Agonist für TLR2 oder LPS als Agonist für TLR4, stimuliert, ist bereits nach 90 min bei LPS bzw. nach 120 min bei Pam3CSK4 eine Ausschüttung von TNF- α zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass die synthetischen Peptidoglykanstrukturen zur TNF- α -Freisetzung in Monozyten entweder einen langsameren Signalweg beschreiten als die Agonisten für die extrazellulären Toll-like Rezeptoren, oder dass durch die Aufnahme der synthetischen Strukturen in die Zelle eine zeitliche Verzögerung bei der Induktion von TNF- α auftritt. 2003 konnte gezeigt werden, dass Muramyldipeptid als minimales Peptidoglykanfragment vom intrazellulären PRR NOD2 erkannt wird^{45;46;48-50}. NOD2 ist als intrazelluläres Protein nicht auf der Zelloberfläche exprimiert, sodass der Kontakt zwischen NOD2-

Agonist und NOD2-Protein im Gegensatz zur Erkennung von spezifischen TLR-Liganden und extrazellulär exprimierten TLRs im Zytoplasma stattfinden muss. Die Beobachtung der zeitlich verzögerten TNF- α -Freisetzung von Monozyten nach Stimulation mit aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen aus Abbildung 28 wurde anhand von Phosphorylierungsstudien über die Zeit von MAP-Kinasen verifiziert (Abbildung 31). MAP-Kinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung nach Stimulation von Monozyten durch TLR-Agonisten und NOD2-Liganden^{80;81}. Dabei werden die MAP-Kinasen ERK, p38 und JNK nach Stimulation der Zelle phosphoryliert, wodurch sie über weitere Phosphorylierungsschritte wiederum an der Transkription von entzündungsrelevanten Genen, wie beispielsweise Zytokinen, beteiligt ist⁸².

Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von ERK und p38 in den mit den aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen TSDiP und MDP stimulierten Monozyten im Vergleich zu den mit LPS stimulierten Monozyten um 20 – 50 min verzögert auftritt (Abbildung 31). Die verzögerte inflammatorische Aktivierung der Immunzellen lässt sich in einer Phosphorylierung von ERK nach 30 min und einer Phosphorylierung von p38 nach 60 min im Vergleich zu einer Phosphorylierung von ERK und p38 nach 10 min bei einer Stimulation mit LPS deutlich erkennen. Wie schon bei der Freisetzungskinetik von TNF- α nach Stimulation mit aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen beobachtet werden konnte, tritt die Aktivierung der Immunzellen zeitlich verzögert auf. Dies bestätigt die Beobachtung, dass der Beginn der Aktivierung der Signalkaskade später eintritt als nach Stimulation mit LPS über den extrazellulären Toll-like Rezeptor 4 (Abbildung 31). Durch den zeitlichen Verlauf der Aufnahme der aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen in die Zelle verzögert sich die Aktivierung der Signalkaskade, wodurch sich die späte Phosphorylierung der MAP-Kinasen (Abbildung 31) und die verzögerte Freisetzung von TNF- α erklären lassen (Abbildung 28)³⁴. Der zeitliche Unterschied in den beobachteten Verzögerungen (20 – 50 min bei der Phosphorylierung der MAP-Kinasen im Gegensatz zu 120 min bei der TNF- α -Freisetzung) kann vermutlich auf unterschiedlich beschrittene Signalwege nach der Phosphorylierung der MAP-Kinasen zurückgeführt werden, welche aber beide schließlich zur Induktion von TNF- α führen. Um diese Aussage verifizieren zu können, müssten weiterführende Untersuchungen zu den durch synthetische Peptidoglykanstrukturen induzierten Signalwegen durchgeführt werden.

Um die Stimulationskinetik der aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen genauer überprüfen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern an der NF- κ B-Untereinheit p65 durchgeführt. P65 wird nach Aktivierung humaner Monozyten durch Virulenzfaktoren als Untereinheit von NF- κ B in den Zellkern translokiert, was zu einer Transkription von Zytokingenen führt⁸³. Wie bereits von Girardin *et al.*⁵⁰ gezeigt werden konnte, ist die Translokation von p65 ein Indiz für die Aktivierbarkeit von Zellen. Der Nachweis der p65-Translokation nach Stimulation von Monozyten mit TSDiP konnte erst nach 60 min erbracht werden (Abbildung 30 A)), wohingegen die NF- κ B-Untereinheit p65 der mit Pam3CSK4 stimulierten Monozyten schon nach einer 30-minütigen Stimulation im Kern lokalisiert zu sehen ist (Abbildung 30 B)). Die im Vergleich zur Pam3CSK4-Stimulation verzögerte Aktivierung der Monozyten nach Inkubation mit TSDiP ist ein weiteres Indiz für einen verzögerten Verlauf der Aufnahme der NOD-Stimuli in die Zelle. Die Translokation von p65 ist nach einer Stimulation mit TSDiP nach 120, 150 und 180 min zu beobachten, wobei der Aktivierungseffekt nach 210 und 240 min Stimulation nicht mehr nachzuweisen

ist. Dies deutet auf eine transiente Aktivierung der Zellen hin, wie sie auch bei vielen anderen Stimuli beobachtet werden kann. Nach Stimulation mit Pam3CSK4 ist die transiente p65-Translokation bereits nach 90 min auf Ausgangsniveau reduziert. Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass eine Stimulation von Monozyten mit aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen eine im Vergleich zu extrazellulär mit TLR-Liganden stimulierten Zellen verzögerte transiente Aktivierung hervorruft. Dies ist zu erkennen an der zeitlich später einsetzenden MAP-Kinase-Phosphorylierung (Abbildung 31), TNF- α -Freisetzung (Abbildung 28) und p65-Translokation (Abbildung 30 A) und B)).

Einfluss von TLR-Rezeptoren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass synthetische Peptidoglykanstrukturen mit mindestens zwei und maximal drei Aminosäuren und unabhängig von der Anzahl der Saccharidmoleküle in mononukleären Zellen und Monozyten eine inflammatorische Aktivierung hervorrufen, sollte geklärt werden, ob diese Aktivierung im Zusammenhang mit den extrazellulären PRRs für PAMPs des angeborenen Immunsystems steht. Da die synthetischen Peptidoglykanstrukturen Bestandteile des natürlich vorkommenden Peptidoglykans darstellen⁵¹ und Peptidoglykan bis zur Veröffentlichung von Travassos *et al.* 2004, in der die TLR2-Unabhängigkeit von PG erstmals beschrieben wurde, als potenter TLR2-Stimulus angesehen wurde²², wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur TLR2- und TLR4-induzierten Aktivierung durch synthetische Peptidoglykanstrukturen durchgeführt. Anlass zur Einbeziehung von TLR4 in die folgenden Untersuchungen waren Publikationen von Inohara *et al.*, Girardin *et al.* und Ogura *et al.*, in denen von einer NOD-abhängigen LPS-Erkennung berichtet wurde^{38;45;45;59}. Diese Beobachtung konnte allerdings später widerlegt werden, indem eine Verunreinigung der LPS-Präparation mit Peptidoglykanfragmenten, die schließlich für die NOD-Aktivierung verantwortlich war, nachgewiesen werden konnte^{46;49;50;84}.

Es konnte gezeigt werden, dass die Blockierung des Rezeptors TLR2 und des Adaptermoleküls CD14 zu keiner Beeinflussung der durch synthetische Peptidoglykanstrukturen induzierten TNF- α -Freisetzung führt (Abbildung 13 und 14). Die TLR2-Unabhängigkeit konnte dann durch Studien mit transient transfizierten HEK293-Zellen und CHO-Zellen verifiziert werden (Abbildung 15 und 16). Ebenso konnte eine Beteiligung von TLR4/MD2/CD14 an der Aktivierung von HEK293-Zellen ausgeschlossen werden. Nach der Identifizierung von NOD2 als intrazellulärer Rezeptor für Bestandteile des Peptidoglykans Gram-positiver Bakterien (genauer MDP)^{45;46;48-50} sollte im Rahmen der im Folgenden diskutierten Versuche ein Nachweis der Beteiligung von NOD2 an der Erkennung synthetischer Peptidoglykanstrukturen erbracht werden.

NOD2 als Rezeptor für synthetische Peptidoglykanstrukturen

Obwohl in sämtlichen in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen und Zelllinien ein Nachweis von NOD1- und NOD2-mRNA mittels PCR erbracht werden konnte (Abbildung 17), waren untransfizierte HEK293-Zellen und CHO-Zellen mit MDP oder synthetischen Peptidoglykanstrukturen nicht stimulierbar. Möglicherweise exprimieren diese Zellen nicht die für eine erfolgreiche Erkennung notwendige Menge des NOD2-Proteins, wie sie beispielsweise in mononukleären Zellen oder Monozyten zu finden sind. Um diese Aussage verifizieren zu können, müsste ein Protein-Nachweis des exprimierten NOD2-Proteins mithilfe eines geeigneten Antikörpers im Westernblot sowie dessen anschließender

Quantifizierung durchgeführt werden. Denkbar wäre auch, dass synthetische Peptidoglykanfragmente durch einen anderen Mechanismus oder Rezeptor als NOD2 eine inflammatorische Aktivierung in mononukleären Zellen und Monozyten auslösen. Aus diesem Grund wurden NOD1- und NOD2-kodierende Plasmide hergestellt, um die NOD1- bzw. NOD2-Abhängigkeit der Stimulation von synthetischen Peptidoglykanstrukturen aufzeigen zu können.

Es konnte gezeigt werden, dass die bereits in mononukleären Zellen und Monozyten aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen in mit NOD2-kodierenden Plasmiden transient transfizierten HEK293-Zellen eine Ausschüttung des Entzündungsmarkers IL-8 induzieren (Abbildung 23 und 24 A) und B)). Dabei sind auch in diesem Modell die unaktiven, synthetischen Peptidoglykanstrukturen mit mehr als drei Aminosäuren nicht in der Lage, transfizierte HEK293-Zellen zu aktivieren. Somit kann bestätigt werden, dass die aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen, denen das minimale NOD2-Erkennungsfragment MDP gemeinsam ist, über NOD2 erkannt werden und Immunzellen dadurch zu einer Ausschüttung inflammatorischer Zytokine veranlassen.

Da bereits 1990 gezeigt werden konnte, dass bei der Erkennung von Virulenzfaktoren Rezeptormoleküle wie CD14 eine wichtige Rolle spielen⁸⁵⁻⁹³, wurde der Frage nachgegangen, ob CD14 bei der Erkennung von Peptidoglykanstrukturen über NOD2 ebenfalls eine Bedeutung hat. Durch die funktionelle Blockierung des Proteins CD14 auf der Oberfläche von Monozyten durch einen monoklonalen Antikörper konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Beteiligung von CD14 an der Erkennung synthetischer Peptidoglykanstrukturen ausgeschlossen werden (Abbildung 25). Dies lässt sich damit begründen, dass CD14 unter anderem als Membranprotein, welches extrazellulär in der Membran verankert ist, oder als lösliches Protein im extrazellulären Raum vorkommt⁹⁴. Somit steht CD14 aufgrund räumlicher Distanzen für eine Komplexbildung mit dem intrazellulären NOD2-Protein nicht zur Verfügung. Auf der anderen Seite könnte allerdings eine lösliche Form des Proteins CD14 eine wichtige Rolle bei der Präsentation und Verfügbarkeit der NOD2-Liganden spielen, indem es z. B. im Serum von Patienten mit akuter Inflammation die spezifischen NOD2-Liganden bindet und somit den Immunzellen zur Verfügung stellt. Diese wichtige Rolle konnte CD14 bereits bei der Erkennung von LPS und PG zugeschrieben werden, da das in höheren Serumkonzentrationen vorkommende lösliche CD14 bei Patienten mit einer akuten Inflammation die vorkommenden Pathogenitätsfaktoren, wie z. B. PG und LPS, bindet und den Immunzellen dadurch zugänglicher macht^{42;86}. Dziarski *et al.* konnte zudem zeigen, dass lösliches CD14 die Struktur MDP in immobilisierter Form bindet, was auf das Vorhandensein polymerer Formen von MDP oder PG für deren Erkennung durch CD14 hinweist⁹⁵. Diese Tatsache könnte auf eine Rolle von CD14 bei der zellulären Aufnahme von synthetischen Peptidoglykanstrukturen hindeuten, wie es bereits von Aderem *et al.* bei der Aufnahme von Bakterien gezeigt werden konnte⁹⁶. Dabei spielt CD14 neben anderen membrangebunden Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Induktion der zellulären Aufnahme durch die Immunzellen.

Antagonistische Effekte spielen in den medikamentösen Therapien heutzutage eine wichtige Rolle. Dabei macht man sich die Tatsache zunutze, dass das eingesetzte antagonistische Medikament die Bindungsstelle des Zielproteins für z.B. Inflammationsmarker wie TNF- α blockiert und dadurch keine Signalweiterleitung mehr stattfinden kann. Diese Tatsache spiegelt sich in der Therapie mit Antikörpern gegen TNF- α (*Biologicals*) wider⁹⁷, wie sie unter anderem bei der Behandlung der rheumatischen Arthritis oder Psoriasis eingesetzt wird^{98;99}. Diese so genannten *Biologicals* werden biopharma-

zeitlich unter Zuhilfenahme fermentierender Anlagen und gentechnisch veränderter Organismen in großem Umfang produziert und die hergestellten Proteine nach deren Aufreinigung für die medizinische Therapie verwendet. Bei der Therapie mit den anti-TNF-Rezeptor Antikörpern blockieren diese den TNF-Rezeptor, wodurch das native TNF- α keine Aktivierung der Zielzelle induzieren kann¹⁰⁰. Auch bei der mit NOD2-Mutationen in Verbindung gebrachten Krankheit Morbus Crohn könnte hier ein Ansatzpunkt zur Aufklärung der Krankheitsfaktoren liegen. Nach Erkenntnissen von Kobayashi *et al.* verhindert die Erkennung von Peptidoglykanstrukturen über NOD2 in den Epithelzellen des Darms, z. B. durch die Regulierung der Expression von α -Defensinen, welche als antiinflammatorische Proteine bei der Wirtsverteidigung eine große Rolle spielen, normalerweise eine Hyperinflammation¹⁰¹. Liegt allerdings eine NOD2-Mutation vor, so geraten die sonst im Gleichgewicht stehenden Prozesse zur Regulierung der intestinalen Entzündung ins Wanken, und eine chronische Inflammation des Darms ist die Folge (Morbus Crohn)^{35;101}. Hier stellt sich die Frage, ob die bei Morbus Crohn-Patienten beobachtete Hyperinflammation neben den bereits beschriebenen NOD2-Mutationen auch durch antagonistische Effekte erklärt werden kann^{35;36;102}. Antagonistische Substanzen könnten die Bindungsstelle für NOD2-Liganden blockieren und somit eine Hyperinflammation induzieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob das inaktive synthetische Peptidoglykanfragment TSPentaP aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit den aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen antagonistische Eigenschaften bei der Aktivierung humaner Immunzellen durch aktive synthetische Peptidoglykanstrukturen aufweist (Punkt 3.9). Allerdings konnte bei einer Vorinkubation mit TSPentaP weder bei MNCs (Abbildung 27) noch bei HEK293-Zellen (Abbildung 26) ein antagonistischer Effekt des inaktiven synthetischen Peptidoglykanfragmentes TSPentaP beobachtet werden. Die Vermutung liegt nahe, dass die Bindungsstelle des NOD2 für die aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen nur Di- bzw. Tripeptide erkennt und alle längeren Peptidketten aus sterischen Gründen nicht erkannt werden können. Daher ist kein antagonistischer Effekt des TSPentaP zu erkennen.

Es konnte gezeigt werden, dass aktive synthetische Peptidoglykanstrukturen über NOD2 erkannt werden und dass das Adaptormolekül CD14 hierbei keine Rolle spielt. Darüber hinaus ist ein antagonistischer Effekt von inaktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen nach Vorinkubation mit TSPentaP nicht zu beobachten.

Lokalisation von NOD2

NOD2 wurde in der Literatur bereits mehrfach als intrazelluläres Protein beschrieben^{45;46;48-50}, nur konnte bis vor kurzem kein eindeutiger Nachweis der intrazellulären Lokalisation von NOD2 erbracht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Aufklärung der Lokalisation von NOD2 und eventuell vorkommenden Interaktionen mit anderen Signalproteinen bzw. Zellkompartimenten Untersuchungen am konfokalen Laserscanningmikroskop durchgeführt. Die gewonnenen Daten sollten Aufschluss über den Transport und die Lokalisation des NOD2-Proteins in der Zelle liefern.

Erste Untersuchungen zeigen, dass NOD2 in Monozyten und in HEK293-Zellen intrazellulär in der Nähe der Kernbucht lokalisiert ist (Abbildung 41 und 45) und dass das Fluoreszenzsignal des sekundären Antikörpers nicht homogen detektierbar ist, sondern dass es eine körnige Struktur aufweist. Auch Barnich *et al.* konnten kürzlich die NOD2-Proteine in HEK293-Zellen intrazellulär lokalisieren¹⁰³.

Eine Assoziation der NOD2-Proteine mit Zellkompartimenten könnte der Grund für das heterogene, körnige Signal sein. Ein homogenes Signal würde auf eine freie Verfügbarkeit von NOD2 im Zytoplasma hinweisen. Der Golgiapparat und das endoplasmatische Retikulum (ER) stehen in Verbindung mit Proteinmodifikationen und -transport in der Zelle und waren daher von großem Interesse für weitere Untersuchungen¹⁰⁴. Es ist bekannt, dass z. B. bestimmte Rezeptoren über das ER, den Golgiapparat und den daraus abgeschnürten Golgivesikeln durch das Zytoplasma unter anderem an die Zellmembran transportiert werden, an der eine Verschmelzung der Golgivesikel mit der Zellmembran stattfindet und dadurch die Rezeptoren bzw. Proteine eine Assoziation mit der Zellmembran eingehen¹⁰⁵. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine partielle Kolokalisation von NOD2 mit dem Golgiapparat und dem ER in Monozyten nachzuweisen ist, jedoch auch Signale von NOD2-Proteinen im Zytoplasma ohne Assoziation mit dem Golgiapparat oder dem ER zu detektieren sind (Abbildung 43). Die Assoziation von NOD2 mit dem Golgiapparat ist dabei stärker als die Kolokalisation mit dem ER. Da das ER u. a. an der Translation und Faltung von Proteinen beteiligt ist¹⁰⁶, deutet die Kolokalisation von NOD2 und dem ER auf eine Modulation von NOD2 im ER hin. Die Assoziation von NOD2 mit dem Golgiapparat ist bedeutend bei der Distribution von NOD2 nicht nur in Monozyten, denn auch in HEK293-Zellen ist eine deutliche Kolokalisation von NOD2 mit dem in der Kernbucht befindlichen Golgiapparat zu detektieren (Abbildung 48). Die lokale Präsenz des NOD2-Proteins nach Stimulation mit dem aktiven synthetischen Peptidoglykanfragment TSDiP und damit einhergehend die Intensität der fluoreszierenden Signale war ein weiterer wichtiger Aspekt der Untersuchungen am konfokalen Laserscanningmikroskop (Abbildung 49). Die Analysen sollten Aufschluss über die Distribution von NOD2 nach der Stimulation mit TSDiP im Verlaufe der Zeit geben, um Ansatzpunkte über eventuell auftretende Assoziationen mit leicht zugänglichen Zellkompartimenten zu liefern. Eine Zunahme des fluoreszierenden Signals aufgrund einer Akkumulation der NOD2-GFP-Proteine nach Stimulation der HEK293-Zellen über einen Zeitraum von 90 min ist in Abbildung 49 deutlich sichtbar. Die Verstärkung der bereits existierenden Fluoreszenzsignale deutet auf eine starke Akkumulation nach Stimulation hin, was bei einer Stimulation mit einem NOD2-unabhängigen Stimulus wie beispielsweise TNF- α nicht zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt). Die zunehmende zelluläre Lokalisation des NOD2-Signals ist übereinstimmend mit der Lokalisation des Golgiapparates (Abbildung 48). Eine bedeutende Rolle des Golgiapparates bei der Distribution von NOD2 in HEK293-Zellen ist somit wahrscheinlich. Genauere Mechanismen der Distribution müssten allerdings in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits nachgewiesen werden, dass NOD2 Strukturen des Peptidoglykans Gram-positiver Bakterien erkennt und diese Erkennung zu einer inflammatorischen Aktivierung humaner Immunzellen führt. Es wurde bereits berichtet, dass phagozytierte Bakterien in den aus Phagosomen resultierenden Lysosomen durch Enzyme degradiert werden¹⁰⁷ und dabei Peptidoglykan bzw. Peptidoglykanfragmente freigesetzt werden. Hier könnte der Angriffspunkt von NOD2 liegen, indem der Ort der Erkennung von Peptidoglykanstrukturen durch NOD2 in der Nähe der Lysosomen lokalisiert ist. Um diese These zu stützen, wurden Kolokalisationsstudien von NOD2 mit Lysosomen in Monozyten und in HEK293-Zellen durchgeführt (Abbildung 42 und 47). In Monozyten konnte keine und in HEK293-Zellen eine partielle Kolokalisation von NOD2 mit Lysosomen beobachtet werden. Der Unterschied der untersuchten Zelltypen könnte hierbei ausschlaggebend sein: HEK293-

Zellen sind eine epitheliale Zelllinie, wohingegen Monozyten zu den Leukozyten des menschlichen Immunsystems zählen. Da Epithelzellen, wie sie im Lungengewebe oder der Schleimhaut des Darms vorkommen, häufiger pathogenen Krankheitserregern ausgesetzt sind als Monozyten im Blut ¹⁰⁸, könnte ein unterschiedlicher Transportmechanismus der Peptidoglykanstrukturen für die beobachteten Unterschiede in den Zellen verantwortlich sein. Zur Verifizierung dieser Aussage sind allerdings weiterführende Untersuchungen erforderlich.

Zelluläre Aufnahme der synthetischen Peptidoglykanstrukturen

Über die intrazellulären Toll-like Rezeptoren 3, 7/8 und 9 des angeborenen Immunsystems ist bekannt, dass die Präsentation und Erkennung der Nukleinsäureliganden in Endosomen stattfindet ¹⁰⁹⁻¹¹⁴. Dabei werden die Pathogene über eine rezeptorvermittelte Phagozytose in frühen Endosomen in die Zelle transportiert und die enzymatisch aufgeschlossenen, pathogenspezifischen Moleküle über MHC Moleküle auf der Oberfläche der Zellen präsentiert ⁹⁶. Darüber hinaus werden bei der Degradation der phagozytierten Bakterien und Viren pathogene Nukleinsäuren freigesetzt, die wiederum von den endosomal lokalisierten TLR3, TLR7/8 und TLR9 erkannt werden. Da über die Aufnahme und den Transport der Liganden des intrazellulären Rezeptors NOD2 kaum etwas bekannt ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, wie die NOD2-Agonisten in die Zielzelle gelangen und wie sie intrazellulär transportiert werden. Genauer untersuchte Aufnahmemechanismen waren hierbei die Phagozytose und die Makropinozytose.

Es ist bekannt, dass bakterielle Pathogenitätsfaktoren in Immunzellen eine Signalkaskade aktivieren können, die die Polymerisation von Aktinfilamenten des Zytoskeletts und dadurch die Ausbildung von Phagosomen initiiert ¹¹⁵. Eine Beteiligung der Phagozytose an der Erkennung synthetischer Peptidoglykanstrukturen wurde bis heute nicht nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine nach Vorinkubation mit Cytochalasin D auftretende Reduktion der Anzahl aufgenommener fluoreszierender Latexbeads um knapp 40% (Abbildung 32 und 33) und eine um ca. 50% reduzierte Freisetzung von TNF- α nach Stimulation mononukleärer Zellen mit dem phagozytoseabhängigen Stimulus Zymosan (Abbildung 35) festgestellt werden, ohne jedoch die Stimulierbarkeit der mononukleären Zellen durch aktive synthetische Peptidoglykanstrukturen zu beeinflussen (Abbildung 35). Dies deutet auf einen phagozytoseunabhängigen Transport der synthetischen Peptidoglykanstrukturen in die Zelle hinein hin, da Cytochalasin D als Toxin des Pilzes *Zygosporium mansonii* die Polymerisation von Actin- und Mikrotubulinfilamenten des zellulären Cytoskeletts, die für die Phagozytose unabdingbar sind, verhindert ^{110;116-119}. Die 50%ige Reduktionsrate der Phagozytoseaktivität (FACS-Analyse, Abbildung 32) und der TNF- α -Freisetzung (ELISA, Abbildung 35) der mit Cytochalasin D vorbehandelten Zellen konnte auch durch Einsatz höherer Mengen Cytochalasin D oder eine Verlängerung der Vorinkubationszeit nicht gesteigert werden. Allerdings konnte im konfokalen Laserscanningmikroskop eine nahezu vollständige Blockierung der Phagozytose durch die Vorinkubation von Monozyten mit phagozytosehemmenden Substanzen nachgewiesen werden. Der Unterschied in den Ergebnisse dieser beiden Detektionsmethoden (FACS und konfokale Laserscanningmikroskopie) geht wahrscheinlich auf die Tatsache zurück, dass im konfokalen Laserscanningmikroskop genau zwischen phagozytierten und von außen angehafteten FITC-gekoppelten Latexbeads unterschieden werden kann. Im FACS hingegen können phagozytierte FITC-gekoppelte Latexbeads und an den Zellen außen angehaftete Beads

nicht unterschieden werden. Untersuchungen mit anderen phagozytoseblockierenden Substanzen, wie Monodansylcadaverin (MDC) oder Azid, konnten die Beobachtungen an den mit Cytochalasin D vorbehandelten Zellen im ELISA allerdings nicht bestätigen (Abbildungen 36 und 37), auch wenn die FACS-Analyse bzw. konfokale Laserscanningmikroskopie der mit MDC oder Azid behandelten Zellen eine reduzierte Aufnahme bzw. eine nahezu vollständige Blockade der Aufnahme von FITC-gekoppelten Latexbeads erkennen lässt (Abbildung 32 und 33). Diese Reduktion bzw. Blockade deutet darauf hin, dass der Einfluss der phagozytoseblockierenden Substanzen MDC und Azid auf die Aufnahme der FITC-gekoppelten Latexbeads spezifisch ist, und dass eine Beeinflussung der TNF- α -Freisetzung nach Behandlung mit diesen Substanzen nicht nachzuweisen ist. Es ist lediglich eine allgemeine Reduktion der TNF- α Ausschüttung (auch nach phagozytoseunabhängiger TLR4-Stimulation mit LPS¹²⁰) zu beobachten, was im Fall von Azid auf deren Zytotoxizität¹²¹ und im Fall von MDC auf die Inhibition der Transglutaminase¹²², einem an der Internalisierung von Rezeptoren beteiligten membrangebundenen Enzym, zurückzuführen ist. Darüber hinaus kann die MDC- und Azid-induzierte Beeinflussung der Phagozytoseaktivität in den FACS-Analysen und in der konfokalen Mikroskopie, aber nicht in den ELISA-Daten dadurch erklärt werden, dass MDC und Azid eventuell einen Einfluss auf die TNF- α -Freisetzung, aber nicht auf die Aufnahme synthetischer Peptidoglykanstrukturen haben.

Neben der Phagozytose spielt aber auch der actinunabhängige Mechanismus der Makropinozytose eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von beispielsweise Antigenen oder Wachstumsfaktoren¹¹⁰. Makropinozytose ist charakterisiert durch die Aufnahme von Molekülen in heterogene dynamische Vesikel, die größer als 1 μm im Durchmesser sind und actinunabhängig durch die Formation von Pseudopodien gebildet werden^{109;110;115;117}. Eine Blockierung der Makropinozytose kann durch eine Vorbehandlung der Zellen mit der Substanz 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amilorid (EIPA) induziert werden, welche den Na^+/H^+ -Austausch in der Zelle hemmt und dadurch die Formation von Makropinosomen verhindert^{110;123-125}. Makropinozytose wird innerhalb von Sekunden bzw. Minuten nach der Stimulation der Immunzellen vollzogen^{110;115} und müsste sich bei einer erfolgreichen Blockade der Makropinozytose durch EIPA als der durch synthetische Peptidoglykanstrukturen induzierte, aktivierte Aufnahmemechanismus identifizieren lassen. Die Daten aus Abbildung 40 verdeutlichen, dass eine Stimulation von bereits 5 min ausreicht, um Monozyten zu einer TNF- α -Freisetzung anzuregen. Somit könnte der Mechanismus der Makropinozytose als Aufnahmemechanismus der synthetischen Peptidoglykanfragmente in die Zelle infrage kommen, obwohl in der vorliegenden Arbeit keine Beeinflussung durch Amiloride auf die durch aktive synthetische Peptidoglykanstrukturen induzierte TNF- α -Freisetzung nachzuweisen war (Abbildung 38). Nakase *et al.*¹²⁶ konnten 2004 zeigen, dass der Transport argininreicher Peptide makropinozytoseabhängig ist und dass der Transport dieser Peptide durch die Vorbehandlung der Zellen mit EIPA blockiert werden konnte. Eventuell spielen die hydrophoben oder hydrophilen Eigenschaften der von Nakase *et al.* verwendeten Peptide eine Rolle bei dem Aufnahmemechanismus in die Zelle¹³⁸. Bemerkenswert allerdings ist der Einfluss der Substanz EIPA auf die Translokation von p65 in den Zellkern von Monozyten nach Stimulation mit TSDiP (Abbildung 34). Es konnte festgestellt werden, dass eine Vorbehandlung der Zellen mit EIPA, gefolgt von einer Stimulation mit dem aktiven synthetischen Peptidoglykanfragment TSDiP, eine Translokation von p65 in den Zellkern verhindert. Dieses Phänomen ist nach einer Stimulation mit

LPS nicht zu beobachten (Abbildung 34). Dies deutet darauf hin, dass die Vorbehandlung der Monozyten mit EIPA einen Einfluss auf die p65-Translokation, jedoch nicht auf die TNF- α Ausschüttung infolge einer Stimulation mit TSDiP hat. Dies lässt darauf schließen, dass bei der TNF- α Ausschüttung und der p65-Translokation unterschiedliche Signalkaskaden eine Rolle spielen, in denen verschiedene Mechanismen der Signalweiterleitung involviert sind. Z. B. könnte eine Beeinflussung der Assoziation von NOD2 mit RIP2 nach Stimulation mit synthetischen Peptidoglykanstrukturen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte (Abbildung 44), in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden. Diese Assoziation erfolgt im Zuge der Zellaktivierung als Teil der induzierten Signalkaskade^{60;127-129}. Bereits Pauleau *et al.* konnten zeigen, dass eine Interaktion von NOD2 und RIP2 über deren CARD-Domänen als Zeichen der Zellaktivierung nachzuweisen ist⁶⁰. Die im Zuge der Zellaktivierung induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinasen bleibt durch die Vorbehandlung mit EIPA allerdings unbeeinflusst. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass eine Vorbehandlung von Monozyten mit EIPA gefolgt von einer Stimulation mit TSDiP bzw. MDP die Phosphorylierung der MAP-Kinasen nicht verhindert (Abbildung 39). Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung der MAP-Kinasen nach Stimulation mit TSDiP bzw. MDP Bestandteil des aktivierten Signalwegs ist und darüber hinaus von einer EIPA-Vorbehandlung unbeeinflusst bleibt. Im Gegensatz dazu könnte ein durch EIPA blockierbarer Mechanismus für die Signalweiterleitung nach der MAP-Kinasen-Phosphorylierung von Bedeutung sein. In weiteren Analysen könnte die Beteiligung dieser durch EIPA beeinflussbaren Mechanismen an der p65-Translokation untersucht sowie eine eventuelle Aufnahme der synthetischen Strukturen über einen aktiven und rezeptorvermittelten Transport analysiert werden. Vavrika *et al.* konnten bereits den intestinalen Di- und Tripeptid-Transporter, *human Peptide Transporter 1* (hPepT1), identifizieren, der beim apikalen Transport der Peptidoglykanstruktur MDP in Epithelzellen von großer Bedeutung ist^{54;122}. Der direkte Transport in die Zelle konnte allerdings nur in Epithelzellen und nicht in humanen Immunzellen, wie beispielsweise Monozyten, nachgewiesen werden. Ferner müsste in fortführenden Untersuchungen der hPepT1-vermittelte Transport aktiver synthetischer Peptidoglykanstrukturen gezeigt werden, um einen eindeutigen Zusammenhang des hPepT1-Transporters mit der Erkennung bakterieller synthetischer Peptidoglykanstrukturen über den intrazellulären Rezeptor NOD2 darstellen zu können. Zur Untersuchung dieser Hypothese wäre eine Blockade des hPepT1-Transporters durch die Substanz Valacyclovir denkbar, wie sie bereits von Phan *et al.* gezeigt werden konnte¹³⁰. Auch Studien mit spezifischer hPepT1 siRNA könnten die Beteiligung des humanen Peptidtransporters 1 am Transport synthetischer Peptidoglykanstrukturen in die Zelle verifizieren⁵⁴.

Zusammenfassend kann die Beteiligung der Phagozytose als Prozess der zellulären Aufnahme bei der Stimulation humaner Monozyten mit aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen ausgeschlossen werden. Makropinozytose scheint bei der p65-Translokation, aber nicht bei der Freisetzung von TNF- α nach der Stimulation mit TSDiP eine Rolle zu spielen.

Differenzielle Genexpression

Die Stimulierbarkeit von Monozyten mit der aktiven synthetischen Peptidoglykanstruktur TSDiP konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand verschiedener Methoden bereits eindeutig nachgewiesen werden (siehe Abbildungen 12, 30 A) und 31). Dabei wurde u. a. die Freisetzung des inflammatorischen Zyto-

kin TNF- α als Antwort auf die Stimulation mit TSDiP detektiert. Ob nach Stimulation mit aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen in Monozyten noch andere Zytokine bzw. deren Rezeptoren auf Genebene reguliert werden, sollte anhand von Genarray-Analysen geklärt werden (Punkt 3.17). Hierzu wurden Genarray-Analysen mit den Genen für inflammatorische Zytokine und deren Rezeptoren im humanen System durchgeführt (Abbildungen 50 und 51). Neben der Hochregulation des Gens TNF- α konnte eine Reihe anderer inflammatorischer Gene identifiziert werden. Ein Gen, das im Vergleich zu unstimulierten Monozyten deutlich reguliert ist, und von dessen Genprodukten ein Einfluss auf die mit NOD2-Mutationen in Verbindung gebrachte Krankheit Morbus Crohn bekannt ist, soll hier eingehender diskutiert werden. Hierbei handelt es sich um das pleiotrope Zytokin IL-6.

IL-6 spielt als antiinflammatorisches Zytokin eine wichtige Rolle bei der Morbus Crohn-bedingten Entzündung der Darmmukosa. Das in den Arrays nach Stimulation mit dem TSDiP im Vergleich zu den unstimulierten Monozyten als hochreguliert detektierte Gen für das Zytokin IL-6 steht in Verbindung mit entzündlichen Darmerkrankungen und konnte von Ito *et al.* im erhöhten Maß im Serum und im Intestinalgewebe von Morbus Crohn-Patienten detektiert werden^{131;131-136}. Auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mittels ELISA bestätigen die im Array detektierte Positiv-Regulation des Gens für IL-6 nach Stimulation mit TSDiP: Im Überstand der für die Arrays verwendeten Monozyten ist ein erhöhtes Niveau an IL-6 zu erkennen (Abbildung 52). Ebenfalls ein erhöhter Level an IL-6 ist nach der Stimulation mit Pam3CSK4 zu beobachten, was die Ähnlichkeit der durch TLR2 bzw. NOD2 induzierten Gene offenbart. Eine Behandlung von Mäusen mit einem Antikörper gegen den IL-6 Rezeptor konnte das Ausmaß einer bestehenden intestinalen Inflammation deutlich reduzieren¹³⁶. Auch ein reduzierter Level an proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , IL-1 β und INF- γ , konnten nach Behandlung mit dem Antikörper gegen den IL-6 Rezeptor im Intestinalgewebe der Mäuse detektiert werden. Kishimoto *et al.* sehen darin eine vielversprechende Therapie gegen Morbus Crohn und verweisen auf die derzeit laufenden klinischen Studien der Phase III bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen¹³⁷.

Durch die Daten der durchgeführten Genarray-Analysen ist der Zusammenhang zwischen der Aktivierung humaner Immunzellen durch TSDiP und der dadurch bedingten Erhöhung des Zytokins IL-6 und der Krankheit Morbus Crohn verdeutlicht worden. Hierdurch sind wichtige Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapien bei Morbus Crohn gegeben worden. Sie könnten in weiterführenden Untersuchungen zu einer geeigneten Therapie dieser Erkrankung führen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Kenntnisse über die Strukturanforderungen an Liganden des intrazellulären Rezeptors NOD2 sowie über dessen Lokalisation in der Zelle, ebenso wie das neu entstandene Wissen über die Aufnahme der NOD2-Liganden in Immunzellen und die durch sie induzierten Zytokinprofile leisten wichtige Beiträge zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Aktivierung intrazellulärer PRRs des angeborenen Immunsystems.

5 Zusammenfassung

Die Familie der intrazellulären NOD-LRRs (NLRs) ist neben den Toll-like Rezeptoren eine wichtige Gruppe von Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems. Das zu den NLRs gehörende NOD2-Protein ist als Rezeptor für einen Bestandteil des Peptidoglykans Gram-positiver Bakterien, Muramyl-dipeptid, beschrieben, und Mutationen im NOD2-Protein werden darüber hinaus mit der chronischen Darmentzündungskrankheit Morbus Crohn in Verbindung gebracht.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum einen der Frage nachgegangen werden, welche Strukturanforderungen an Liganden des intrazellulären Rezeptors NOD2 erfüllt sein müssen, um in humanen Immunzellen eine Entzündungsreaktion auslösen zu können, und zum anderen sollte untersucht werden, welche zellulären Aufnahmemechanismen bei der Aktivierung durch NOD2-Liganden involviert sind. Die durchgeführten Untersuchungen sollten neue Kenntnisse über Struktur-Wirkungsbeziehungen der in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Peptidoglykanstrukturen als NOD2-Liganden sowie deren zelluläre Aufnahme liefern, um mit ihrer Hilfe neue Aspekte über die molekularen Mechanismen der Aktivierung intrazellulärer und mit Morbus Crohn in Verbindung gebrachter Mustererkennungsrezeptoren zu gewinnen.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen zeigen, dass neben dem bereits beschriebenen Muramyl-dipeptid auch größere Fragmente des Peptidoglykans, bestehend aus einem, zwei, vier oder acht Saccharideinheiten mit Peptidseitenketten aus zwei bis drei, jedoch nicht mehr als vier Aminosäuren, in humanen Monozyten eine Immunantwort hervorrufen können. Dabei wird die Inflammation unabhängig von TLRs und dem Rezeptor CD14 ausschließlich über NOD2 vermittelt, wobei erstmals gezeigt werden konnte, dass die Entzündungsparameter wie TNF- α -Ausschüttung, p65-Translokation und MAP-Kinasen-Phosphorylierung im Vergleich zur Stimulation mit extrazellulären TLR-Liganden verzögert auftreten.

Bei der Untersuchung der zellulären Aufnahme der aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen in konnte gezeigt werden, dass der Transport phagozytoseunabhängig ist. Eine Beteiligung der Makropinozytose an der Aufnahme bzw. Initiierung der Entzündungsreaktion konnte teilweise nachgewiesen werden, da die durch die biologisch aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen induzierte p65-Translokation, jedoch nicht die TNF- α -Ausschüttung durch die makropinozytoseblockierende Substanz EIPA gehemmt werden konnte.

Weiterführende Untersuchungen am konfokalen Laserscanningmikroskop zur Lokalisation von NOD2 in der Zelle lieferten Hinweise auf das Vorkommen von NOD2 in der Kernbucht, teilweise kolokalisiert mit dem Golgiapparat und dem ER. Eine Beobachtung über die Zeit ließ eine Akkumulation der NOD2-Proteine nach Stimulation mit biologisch aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen erkennen, was bei einer Stimulation mit anderen inflammationsauslösenden Substanzen nicht beobachtet werden konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Genarray-Analysen zeigen, dass das in Serum und Geweben von Morbus Crohn-Patienten in hohen Mengen vorkommende Zytokin IL-6 neben der Stimulation mit TLR2-Liganden auch nach Stimulation mit aktiven synthetischen Peptidoglykanstrukturen in Monozyten vermehrt induziert wird.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Kenntnisse über die Strukturanforderungen an Liganden des intrazellulären Rezeptors NOD2 sowie dessen Lokalisation in der Zelle und das neu entstandene Wissen über die Aufnahme der NOD2-Liganden in Immunzellen sowie die durch sie induzierten Zytokinprofile liefern einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Aktivierung intrazellulärer Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems.

6 Literatur

1. Murray,P.J. 2005. NOD proteins: an intracellular pathogen-recognition system or signal transduction modifiers? *Curr.Opin.Immunol.* 17:352-358.
2. Martinon,F. and J.Tschopp. 2005. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol.* 26:447-454.
3. Mitta,G., F.Vandenbulcke, and P.Roch. 2000. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.* 486:185-190.
4. Janeway,C.A., Jr. and R.Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 20:197-216.
5. Gourley,T.S., E.J.Wherry, D.Masopust, and R.Ahmed. 2004. Generation and maintenance of immunological memory. *Semin.Immunol.* 16:323-333.
6. Crotty,S. and R.Ahmed. 2004. Immunological memory in humans. *Semin.Immunol.* 16:197-203.
7. Beutler,B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol.Immunol.* 40:845-859.
8. Triantafilou,M. and K.Triantafilou. 2002. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* 23:301-304.
9. Agrawal,A. 2005. CRP after 2004. *Mol.Immunol.* 42:927-930.
10. Muller,C.A., I.B.Autenrieth, and A.Peschel. 2005. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell Mol.Life Sci.* 62:1297-1307.
11. Takeda,K. and S.Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int.Immunol.* 17:1-14.
12. Lemaitre,B., E.Nicolas, L.Michaut, J.M.Reichhart, and J.A.Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
13. Poltorak,A., X.He, I.Smirnova, M.Y.Liu, C.Van Huffel, X.Du, D.Birdwell, E.Alejos, M.Silva, C.Galanos, M.Freudenberg, P.Ricciardi-Castagnoli, B.Layton, and B.Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282:2085-2088.
14. Medzhitov,R., P.Preston-Hurlburt, and C.A.Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
15. Beutler,B. 2003. Innate immune responses to microbial poisons: discovery and function of the Toll-like receptors. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 43:609-628.
16. Lien,E. and R.R.Ingalls. 2002. Toll-like receptors. *Crit Care Med.* 30:S1-11.

17. Rietschel, E.T., J. Schletter, B. Weidemann, V. El Samalouti, T. Mattern, U. Zahringer, U. Seydel, H. Brade, H.D. Flad, S. Kusumoto, D. Gupta, R. Dziarski, and A.J. Ulmer. 1998. Lipopolysaccharide and peptidoglycan: CD14-dependent bacterial inducers of inflammation. *Microb. Drug Resist.* 4:37-44.
18. Beutler, B. 2004. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430:257-263.
19. Zhang, D., G. Zhang, M.S. Hayden, M.B. Greenblatt, C. Bussey, R.A. Flavell, and S. Ghosh. 2004. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303:1522-1526.
20. Takeuchi, O., T. Kawai, P.F. Muhlradt, M. Morr, J.D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* 13:933-940.
21. Buwitt-Beckmann, U., H. Heine, K.H. Wiesmuller, G. Jung, R. Brock, S. Akira, and A.J. Ulmer. 2005. Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. *Eur. J. Immunol.* 35:282-289.
22. Travassos, L.H., S.E. Girardin, D.J. Philpott, D. Blanot, M.A. Nahori, C. Werts, and I.G. Boneca. 2004. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* 5:1000-1006.
23. Kawai, T. and S. Akira. 2005. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 17:338-344.
24. Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1:135-145.
25. Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303:1526-1529.
26. Takeda, K. and S. Akira. 2003. Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol.* 5:143-153.
27. Takeda, K. 2005. Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J. Endotoxin. Res.* 11:51-55.
28. Beutler, B., K. Hoebe, P. Georgel, K. Tabeta, and X. Du. 2005. Genetic analysis of innate immunity: identification and function of the TIR adapter proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 560:29-39.
29. Ting, J.P. and B.K. Davis. 2005. CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 23:387-414.
30. Yamamoto, M. and S. Akira. 2005. TIR domain-containing adaptors regulate TLR signaling pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.* 560:1-9.
31. Ting, J.P. and K.L. Williams. 2005. The CATERPILLER family: an ancient family of immune/apoptotic proteins. *Clin. Immunol.* 115:33-37.

32. Inohara, N. and G. Nunez. 2003. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat.Rev.Immunol.* 3:371-382.
33. Harton, J.A., M.W. Linhoff, J. Zhang, and J.P. Ting. 2002. Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J.Immunol.* 169:4088-4093.
34. Inohara, Chamaillard, C. McDonald, and G. Nunez. 2005. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu.Rev.Biochem.* 74:355-383.
35. Eckmann, L. and M. Karin. 2005. NOD2 and Crohn's disease: loss or gain of function? *Immunity.* 22:661-667.
36. Hugot, J.P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J.P. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C.A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J.F. Colombel, M. Sahbatou, and G. Thomas. 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411:599-603.
37. Hugot, J.P., J.P. Cezard, J.F. Colombel, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, S. Montague, M. Gassull, S. Christensen, Y. Finkel, C. Gower-Rousseau, R. Modigliani, H. Zouali, S. Lesage, M. Chamaillard, J. Macry, G. Thomas, and J.M. Victor. 2003. Clustering of Crohn's disease within affected sibships. *Eur.J.Hum.Genet.* 11:179-184.
38. Ogura, Y., D.K. Bonen, N. Inohara, D.L. Nicolae, F.F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R.H. Duerr, J.P. Achkar, S.R. Brant, T.M. Bayless, B.S. Kirschner, S.B. Hanauer, G. Nunez, and J.H. Cho. 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411:603-606.
39. Hampe, J., A. Cuthbert, P.J. Croucher, M.M. Mirza, S. Mascheretti, S. Fisher, H. Frenzel, K. King, A. Hasselmeier, A.J. MacPherson, S. Bridger, S. van Deventer, A. Forbes, S. Nikolaus, J.E. Lennard-Jones, U.R. Foelsch, M. Krawczak, C. Lewis, S. Schreiber, and C.G. Mathew. 2001. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 357:1925-1928.
40. Watanabe, T., A. Kitani, P.J. Murray, and W. Strober. 2004. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat.Immunol.* 5:800-808.
41. Netea, M.G., B.J. Kullberg, D.J. de Jong, B. Franke, T. Sprong, T.H. Naber, J.P. Drenth, and J.W. Van Der Meer. 2004. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur.J.Immunol.* 34:2052-2059.
42. Van Amersfoort, E.S., T.J. Van Berkel, and J. Kuiper. 2003. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin.Microbiol.Rev.* 16:379-414.
43. Hotchkiss, R.S. and I.E. Karl. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N.Engl.J.Med.* 348:138-150.
44. Fournier, B. and D.J. Philpott. 2005. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin.Microbiol.Rev.* 18:521-540.

45. Inohara, N., Y. Ogura, F.F. Chen, A. Muto, and G. Nunez. 2001. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* 276:2551-2554.
46. Girardin, S.E., I.G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D.J. Philpott, and P.J. Sansonetti. 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 278:8869-8872.
47. Berrebi, D., R. Maudinas, J.P. Hugot, M. Chamaillard, F. Chareyre, P. De Lagausie, C. Yang, P. Desreumaux, M. Giovannini, J.P. Cezard, H. Zouali, D. Emilie, and M. Peuchmaur. 2003. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 52:840-846.
48. Inohara, N., Y. Ogura, A. Fontalba, O. Gutierrez, F. Pons, J. Crespo, K. Fukase, S. Inamura, S. Kusumoto, M. Hashimoto, S.J. Foster, A.P. Moran, J.L. Fernandez-Luna, and G. Nunez. 2003. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J. Biol. Chem.* 278:5509-5512.
49. Chamaillard, M., M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, M.A. Valvano, S.J. Foster, T.W. Mak, G. Nunez, and N. Inohara. 2003. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* 4:702-707.
50. Girardin, S.E., I.G. Boneca, L.A. Carneiro, A. Antignac, M. Jehanno, J. Viala, K. Tedin, M.K. Taha, A. Labigne, U. Zahringer, A.J. Coyle, P.S. DiStefano, J. Bertin, P.J. Sansonetti, and D.J. Philpott. 2003. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300:1584-1587.
51. Girardin, S.E., L.H. Travassos, M. Herve, D. Blanot, I.G. Boneca, D.J. Philpott, P.J. Sansonetti, and D. Mengin-Lecreulx. 2003. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J. Biol. Chem.* 278:41702-41708.
52. Cossart, P. and P.J. Sansonetti. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304:242-248.
53. Nguyen, L. and J. Pieters. 2005. The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends Cell Biol.* 15:269-276.
54. Vavricka, S.R., M.W. Musch, J.E. Chang, Y. Nakagawa, K. Phanvijhitsiri, T.S. Waypa, D. Merlin, O. Schneewind, and E.B. Chang. 2004. hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology* 127:1401-1409.
55. Kelsall, B. 2005. Getting to the guts of NOD2. *Nat. Med.* 11:383-384.
56. Ogura, Y., N. Inohara, A. Benito, F.F. Chen, S. Yamaoka, and G. Nunez. 2001. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 276:4812-4818.
57. Chen, C.M., Y. Gong, M. Zhang, and J.J. Chen. 2004. Reciprocal cross-talk between Nod2 and TAK1 signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 279:25876-25882.

58. Inohara, N., T. Koseki, J. Lin, L. del Peso, P. C. Lucas, F. F. Chen, Y. Ogura, and G. Nunez. 2000. An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 275:27823-27831.
59. Girardin, S. E., R. Tournebise, M. Mavris, A. L. Page, X. Li, G. R. Stark, J. Bertin, P. S. DiStefano, M. Yaniv, P. J. Sansonetti, and D. J. Philpott. 2001. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep.* 2:736-742.
60. Pauleau, A. L. and P. J. Murray. 2003. Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. *Mol. Cell Biol.* 23:7531-7539.
61. Kobayashi, K., N. Inohara, L. D. Hernandez, J. E. Galan, G. Nunez, C. A. Janeway, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2002. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* 416:194-199.
62. Kirschning, C. J., H. Wesche, A. T. Merrill, and M. Rothe. 1998. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 188:2091-2097.
63. Yang, R. B., M. R. Mark, A. Gray, A. Huang, M. H. Xie, M. Zhang, A. Goddard, W. I. Wood, A. L. Gurney, and P. J. Godowski. 1998. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395:284-288.
64. Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 11:443-451.
65. Galanos, C., O. Luderitz, and O. Westphal. 1969. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 9:245-249.
66. Aliprantis, A. O., R. B. Yang, M. R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J. D. Radolf, G. R. Klimpel, P. Godowski, and A. Zychlinsky. 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285:736-739.
67. Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe, and C. J. Kirschning. 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 274:17406-17409.
68. Lien, E., T. J. Sellati, A. Yoshimura, T. H. Flo, G. Rawadi, R. W. Finberg, J. D. Carroll, T. Espevik, R. R. Ingalls, J. D. Radolf, and D. T. Golenbock. 1999. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J. Biol. Chem.* 274:33419-33425.
69. Manukyan, M., K. Triantafilou, M. Triantafilou, A. Mackie, N. Nilsen, T. Espevik, K. H. Wiesmuller, A. J. Ulmer, and H. Heine. 2005. Binding of lipopeptide to CD14 induces physical proximity of CD14, TLR2 and TLR1. *Eur. J. Immunol.* 35:911-921.
70. Inohara, N., T. Koseki, L. del Peso, Y. Hu, C. Yee, S. Chen, R. Carrio, J. Merino, D. Liu, J. Ni, and G. Nunez. 1999. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.* 274:14560-14567.

71. Janeway, C.A., Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54 Pt 1:1-13.
72. Inohara, N. and G. Nunez. 2001. The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* 20:6473-6481.
73. Moreillon, P. and P.A. Majcherczyk. 2003. Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria. *Scand. J. Infect. Dis.* 35:632-641.
74. Myhre, A.E., J.F. Stuestol, M.K. Dahle, G. Overland, C. Thiemermann, S.J. Foster, P. Lilleaasen, A.O. Aasen, and J.E. Wang. 2004. Organ injury and cytokine release caused by peptidoglycan are dependent on the structural integrity of the glycan chain. *Infect. Immun.* 72:1311-1317.
75. Sinha, R.K. and R.S. Rosenthal. 1980. Release of soluble peptidoglycan from growing cococci: demonstration of anhydro-muramyl-containing fragments. *Infect. Immun.* 29:914-925.
76. Cookson, B.T., A.N. Tyler, and W.E. Goldman. 1989. Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Biochemistry* 28:1744-1749.
77. Holtje, J.V. 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:181-203.
78. Opitz, B., A. Puschel, B. Schmeck, A.C. Hocke, S. Rosseau, S. Hammerschmidt, R.R. Schumann, N. Suttorp, and S. Hippenstiel. 2004. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 279:36426-36432.
79. Philpott, D.J., S. Yamaoka, A. Israel, and P.J. Sansonetti. 2000. Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J. Immunol.* 165:903-914.
80. Otte, J.M., I.M. Rosenberg, and D.K. Podolsky. 2003. Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine. *Gastroenterology* 124:1866-1878.
81. Schumann, R.R., D. Pfeil, D. Freyer, W. Buerger, N. Lamping, C.J. Kirschning, U.B. Goebel, and J.R. Weber. 1998. Lipopolysaccharide and pneumococcal cell wall components activate the mitogen activated protein kinases (MAPK) erk-1, erk-2, and p38 in astrocytes. *Glia* 22:295-305.
82. Edmunds, J.W. and L.C. Mahadevan. 2004. MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes. *J. Cell Sci.* 117:3715-3723.
83. Panwalkar, A., S. Verstovsek, and F. Giles. 2004. Nuclear factor-kappaB modulation as a therapeutic approach in hematologic malignancies. *Cancer* 100:1578-1589.
84. Chamillard, M., D. Philpott, S.E. Girardin, H. Zouali, S. Lesage, F. Chareyre, T.H. Bui, M. Giovannini, U. Zaehring, V. Penard-Lacronique, P.J. Sansonetti, J.P. Hugot, and G. Thomas. 2003. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:3455-3460.

85. Gegner, J.A., R.J. Ulevitch, and P.S. Tobias. 1995. Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance. Dual roles for LPS binding protein and membrane CD14. *J. Biol. Chem.* 270:5320-5325.
86. Gupta, D., T.N. Kirkland, S. Viriyakosol, and R. Dziarski. 1996. CD14 is a cell-activating receptor for bacterial peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 271:23310-23316.
87. Hailman, E., H.S. Lichenstein, M.M. Wurfel, D.S. Miller, D.A. Johnson, M. Kelley, L.A. Busse, M.M. Zukowski, and S.D. Wright. 1994. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J. Exp. Med.* 179:269-277.
88. Haziot, A., E. Ferrero, F. Kontgen, N. Hijjiya, S. Yamamoto, J. Silver, C.L. Stewart, and S.M. Goyert. 1996. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity.* 4:407-414.
89. Juan, T.S., M.J. Kelley, D.A. Johnson, L.A. Busse, E. Hailman, S.D. Wright, and H.S. Lichenstein. 1995. Soluble CD14 truncated at amino acid 152 binds lipopolysaccharide (LPS) and enables cellular response to LPS. *J. Biol. Chem.* 270:1382-1387.
90. Ulevitch, R.J. and P.S. Tobias. 1994. Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 6:125-130.
91. Weidemann, B., H. Brade, E.T. Rietschel, R. Dziarski, V. Bazil, S. Kusumoto, H.D. Flad, and A.J. Ulmer. 1994. Soluble peptidoglycan-induced monokine production can be blocked by anti-CD14 monoclonal antibodies and by lipid A partial structures. *Infect. Immun.* 62:4709-4715.
92. Weidemann, B., J. Schletter, R. Dziarski, S. Kusumoto, F. Stelter, E.T. Rietschel, H.D. Flad, and A.J. Ulmer. 1997. Specific binding of soluble peptidoglycan and muramyl dipeptide to CD14 on human monocytes. *Infect. Immun.* 65:858-864.
93. Wright, S.D., R.A. Ramos, P.S. Tobias, R.J. Ulevitch, and J.C. Mathison. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433.
94. Bazil, V., M. Baudys, I. Hilgert, I. Stefanova, M.G. Low, J. Zbrozek, and V. Horejsi. 1989. Structural relationship between the soluble and membrane-bound forms of human monocyte surface glycoprotein CD14. *Mol. Immunol.* 26:657-662.
95. Dziarski, R., R.I. Tapping, and P.S. Tobias. 1998. Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. *J. Biol. Chem.* 273:8680-8690.
96. Aderem, A. and D.M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17:593-623.
97. Antoni, C.E. and B. Manger. 2004. [Biologicals: a new therapeutic approach for inflammatory diseases]. *Internist (Berl)* 45 Suppl 1:S31-S37.
98. Botsios, C. 2005. Safety of tumour necrosis factor and interleukin-1 blocking agents in rheumatic diseases. *Autoimmun. Rev.* 4:162-170.

99. Sandborn,W.J. and W.A.Faubion. 2004. Biologics in inflammatory bowel disease: how much progress have we made? *Gut* 53:1366-1373.
100. Dinarello,C.A. 2005. Differences between anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibodies and soluble TNF receptors in host defense impairment. *J.Rheumatol.Suppl* 74:40-47.
101. Kobayashi,K.S., M.Chamaillard, Y.Ogura, O.Henegariu, N.Inohara, G.Nunez, and R.A.Flavell. 2005. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307:731-734.
102. Girardin,S.E., J.P.Hugot, and P.J.Sansonetti. 2003. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol.* 24:652-658.
103. Barnich,N., T.Hisamatsu, J.E.Aguirre, R.Xavier, H.C.Reinecker, and D.K.Podolsky. 2005. GRIM-19 interacts with nucleotide oligomerization domain 2 and serves as downstream effector of anti-bacterial function in intestinal epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 280:19021-19026.
104. Rodriguez-Boulan,E. and A.Musch. 2005. Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms. *Biochim.Biophys.Acta* 1744:455-464.
105. Mancias,J.D. and J.Goldberg. 2005. Exiting the endoplasmic reticulum. *Traffic.* 6:278-285.
106. Kleizen,B. and I.Braakman. 2004. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr.Opin.Cell Biol.* 16:343-349.
107. Pieters,J. 2001. Evasion of host cell defense mechanisms by pathogenic bacteria. *Curr.Opin.Immunol.* 13:37-44.
108. Hurley,B.P. and B.A.McCormick. 2004. Intestinal epithelial defense systems protect against bacterial threats. *Curr.Gastroenterol.Rep.* 6:355-361.
109. Haigler,H.T., J.A.McKanna, and S.Cohen. 1979. Rapid stimulation of pinocytosis in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor. *J.Cell Biol.* 83:82-90.
110. Johannes,L. and C.Lamaze. 2002. Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic.* 3:443-451.
111. Latz,E., A.Schoenemeyer, A.Visintin, K.A.Fitzgerald, B.G.Monks, C.F.Knetter, E.Lien, N.J.Nilsen, T.Espevik, and D.T.Golenbock. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat.Immunol.* 5:190-198.
112. Latz,E., A.Visintin, T.Espevik, and D.T.Golenbock. 2004. Mechanisms of TLR9 activation. *J.Endotoxin.Res.* 10:406-412.
113. Nishiya,T., E.Kajita, S.Miwa, and A.L.Defranco. 2005. TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J.Biol.Chem.*

114. Sioud, M. 2005. Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J.Mol.Biol.* 348:1079-1090.
115. Cardelli, J. 2001. Phagocytosis and macropinocytosis in Dictyostelium: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. *Traffic.* 2:311-320.
116. Sandvig, K. and B.van Deurs. 1990. Selective modulation of the endocytic uptake of ricin and fluid phase markers without alteration in transferrin endocytosis. *J.Biol.Chem.* 265:6382-6388.
117. Chimini, G. and P.Chavrier. 2000. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat.Cell Biol.* 2:E191-E196.
118. Goddette, D.W. and C.Frieden. 1986. Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D. *J.Biol.Chem.* 261:15974-15980.
119. Reynolds, D.J. and J.H.Pearce. 1990. Characterization of the cytochalasin D-resistant (pinocytic) mechanisms of endocytosis utilized by chlamydiae. *Infect.Immun.* 58:3208-3216.
120. Shiratsuchi, A., I.Watanabe, O.Takeuchi, S.Akira, and Y.Nakanishi. 2004. Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages. *J.Immunol.* 172:2039-2047.
121. Chang, S. and S.H.Lamm. 2003. Human health effects of sodium azide exposure: a literature review and analysis. *Int.J.Toxicol.* 22:175-186.
122. Schutze, S., T.Machleidt, D.Adam, R.Schwandner, K.Wiegmann, M.L.Kruse, M.Heinrich, M.Wickel, and M.Kronke. 1999. Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling. *J.Biol.Chem.* 274:10203-10212.
123. Nakase, I., M.Niwa, T.Takeuchi, K.Sonomura, N.Kawabata, Y.Koike, M.Takehashi, S.Tanaka, K.Ueda, J.C.Simpson, A.T.Jones, Y.Sugiura, and S.Futaki. 2004. Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol.Ther.* 10:1011-1022.
124. Kee, S.H., E.J.Cho, J.W.Song, K.S.Park, L.J.Baek, and K.J.Song. 2004. Effects of endocytosis inhibitory drugs on rubella virus entry into VeroE6 cells. *Microbiol.Immunol.* 48:823-829.
125. West, M.A., M.S.Bretscher, and C.Watts. 1989. Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *J.Cell Biol.* 109:2731-2739.
126. Nakase, I., M.Niwa, T.Takeuchi, K.Sonomura, N.Kawabata, Y.Koike, M.Takehashi, S.Tanaka, K.Ueda, J.C.Simpson, A.T.Jones, Y.Sugiura, and S.Futaki. 2004. Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol.Ther.* 10:1011-1022.
127. Abbott, D.W., A.Wilkins, J.M.Asara, and L.C.Cantley. 2004. The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitylation of a novel site on NEMO. *Curr.Biol.* 14:2217-2227.

128. Barnich,N., J.E.Aguirre, H.C.Reinecker, R.Xavier, and D.K.Podolsky. 2005. Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- κ B activation in muramyl dipeptide recognition. *J.Cell Biol.* 170:21-26.
129. Marriott,I., D.M.Rati, S.H.McCall, and S.L.Tranguch. 2005. Induction of Nod1 and Nod2 intracellular pattern recognition receptors in murine osteoblasts following bacterial challenge. *Infect.Immun.* 73:2967-2973.
130. Phan,D.D., P.Chin-Hong, E.T.Lin, P.Anderle, W.Sadee, and B.J.Guglielmo. 2003. Intra- and interindividual variabilities of valacyclovir oral bioavailability and effect of coadministration of an hPEPT1 inhibitor. *Antimicrob.Agents Chemother.* 47:2351-2353.
131. Ito,H. 2003. IL-6 and Crohn's disease. *Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy* 2:125-130.
132. Atreya,R., J.Mudter, S.Finotto, J.Mullberg, T.Jostock, S.Wirtz, M.Schutz, B.Bartsch, M.Holtmann, C.Becker, D.Strand, J.Czaja, J.F.Schlaak, H.A.Lehr, F.Autschbach, G.Schurmann, N.Nishimoto, K.Yoshizaki, H.Ito, T.Kishimoto, P.R.Galle, S.Rose-John, and M.F.Neurath. 2000. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat.Med.* 6:583-588.
133. Atreya,R. and M.F.Neurath. 2005. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin.Rev.Allergy Immunol.* 28:187-196.
134. Ito,H. 2003. Anti-interleukin-6 therapy for Crohn's disease. *Curr.Pharm.Des* 9:295-305.
135. Jones,S.A., S.Horiuchi, N.Topley, N.Yamamoto, and G.M.Fuller. 2001. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J.* 15:43-58.
136. Yamamoto,M., K.Yoshizaki, T.Kishimoto, and H.Ito. 2000. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J.Immunol.* 164:4878-4882.
137. Kishimoto,T. 2005. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu.Rev.Immunol.* 23:1-21.
138. Uehara,A.; Yang,S.; Fujimoto,Y.; Fukase,K.; Kusumoto,S.; Shibata,K.; Sugawara,S.; Takada,H.: Muramyl dipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramylpeptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8. *Cell. Microbiol.* 7(1):53-61.

7 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Domänenstruktur der NLR-Familie (zum Vergleich ist ein R Protein der Pflanzen aufgezeigt) (modifiziert nach Martinon, <i>Trends in Immunology</i> , 2005; 447)	12
Abbildung 2:	Schematische Struktur von Peptidoglycan (PG) mit den durch NOD1 und NOD2 erkannten minimalen Strukturen MDP und ie-DAP (modifiziert nach Girardin; <i>J. Biol. Chem.</i> , 2003; 8869)	14
Abbildung 3:	Durch NLR induzierte Stoffwechselwege (modifiziert nach Kathrine Ris; <i>Nature Medicine</i> , 2005; 383)	15
Abbildung 4:	Strukturformeln der verwendeten synthetischen Peptidoglykanstrukturen und ihre Benennungen.....	22
Abbildung 5:	Vektorkarte des pENTR/D-TOPO-Vektors; Quelle: Invitrogen (Leek, Niederlande)....	33
Abbildung 6:	TOPO Cloning Site des pENTR/D-TOPO-Vektors; Quelle: Invitrogen (Leek, Niederlande)	34
Abbildung 7:	Vektorkarten der Plasmide pENTR/D-TOPO NOD1 und pENTR/D-TOPO NOD2	34
Abbildung 8:	Vektorkarten der Plasmide pcDNA-Dest40 und pcDNA-Dest47; Quelle: Invitrogen (Leek, Niederlande).....	35
Abbildung 9:	Vektorkarten der Plasmide pcDNA-Dest47 NOD1 und pcDNA-Dest47 NOD2	36
Abbildung 10:	Schema der immunhistochemischen Nachweismethode von Proteinen und die Färbung von Organellen	41
Abbildung 11:	Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 4 h stimulierter MNCs mittels ELISA.....	43
Abbildung 12:	Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 4 h stimulierter Monozyten mittels ELISA.....	43
Abbildung 13:	Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 4 h stimulierter und für 30 min mit 10 μ g/ml α -TLR2 Antikörper vorinkubierter humaner Monozyten	44
Abbildung 14:	Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 4 h stimulierter und für 30 min mit 10 μ g/ml α -CD14 Antikörper vorinkubierter humaner Monozyten.....	45
Abbildung 15:	Detektion der TLR2-Aktivierung in 18 h stimulierten CHO-TLR2-Zellen anhand der CD25-Expression im FACS-Calibur. Die Expression von CD25 auf der Zelloberfläche ist angegeben als Geo Mean Fluorescence Intensity [GMFI]	46
Abbildung 16:	Bestimmung der IL-8 Konzentration in Überständen 18 h stimulierter transient transfizierter HEK293-Zellen mittels ELISA	47
Abbildung 17:	0,8 %iges Agarosegel der mittels PCR vervielfältigten NOD1- und NOD2-cDNA verschiedener Zelltypen und -linien. Die PCR-Bedingungen sowie die Sequenzen der verwendeten Primer sind unter 2.2.2.3 in Tabelle 6 und unter Punkt 2.1.8 in Tabelle 5 aufgelistet.....	48

Abbildung 18: Die PCR-Bedingungen sowie die Sequenzen der verwendeten Primer sind unter 2.2.2.3 in Tabelle 7 und 8 sowie unter Punkt 2.1.8 in Tabelle 5 aufgelistet. A) Agarosegelelektrophorese (1 %iges Gel) der mit TOPO-Primern generierten NOD1- und NOD2-CDS PCR-Fragmente. B) Agarosegelelektrophorese (1 %iges Gel) der mittels des SNAP UV-free Purification Kits aufgereinigten PCR-Fragmente.....	49
Abbildung 19: Agarosegelelektrophorese (1 %ige Gele) der mit den Enzymen BsrGI und SacII für 90 min bei 37°C geschnittenen Plasmide pENTR/D-TOPO-NOD1 und pENTR/D-TOPO-NOD2.....	49
Abbildung 20: Agarosegelelektrophorese (1 %ige Gele) der mit den Enzymen SacII und BsrGI für 90 min bei 37°C geschnittenen Plasmide pcDNADest40-NOD1 und pcDNADest40-NOD2.....	50
Abbildung 21: Agarosegelelektrophorese (1 %ige Gele) der mit den Enzymen SacII, XmnI und HindIII für 90 min bei 37°C geschnittenen Plasmide pcDNADest47-NOD1 und pcDNADest47-NOD2.....	51
Abbildung 22: Westernblot der mit pcDNA-Dest40-NOD2 und pcDNADest47-NOD2 sowie als Kontrolle mit pcDNADest47-NOD1 transfizierten HEK293 Zellen. NOD2 wurde mit α -NOD2 Ab detektiert und als Beladungskontrolle diente der Nachweis von p 38 mittels α -p38 Ab.....	52
Abbildung 23: Bestimmung der IL-8-Konzentration in Überständen 18 h stimulierter und mit pcDNANOD1 und pcDNA3NOD2 transient transfizierter HEK293-Zellen mittels ELISA.....	53
Abbildung 24: Bestimmung der IL-8-Konzentration in Überständen stimulierter und mit pcDNADest40-NOD1 und-NOD2 (A und C) und pcDNADest47-NOD1 und -NOD2 (B) transient transfizierter HEK293-Zellen mittels ELISA.....	55
Abbildung 25: Bestimmung der IL-8-Konzentration in Überständen 18 h stimulierter und mit pcDNADest40-NOD2 und pCEP4 CD14 transient transfizierter HEK293-Zellen mittels ELISA	56
Abbildung 26: Bestimmung der IL-8-Konzentration in Überständen 18 h stimulierter, mit 100 und 1000 ng/ml TSPentaP vorinkubierter und mit pcDNADest40 NOD2 transient transfizierter HEK293-Zellen mittels ELISA.....	57
Abbildung 27: Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 4 h stimulierter und mit 100 und 1000 ng/ml TSPentaP vorinkubierter MNCs mittels ELISA.....	58
Abbildung 28: Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 0, 60, 90, 120 und 240 min stimulierter humaner Monozyten mittels ELISA	59
Abbildung 29: Konfokale Laserscanningmikroskopie der für 60 min mit je 100 ng/ml TSDiP und TSTetraP sowie 100 nM Pam3CSK4 stimulierten Monozyten. In rot dargestellt ist die p65-Untereinheit, in blau sind die Nucleinäuren zu erkennen.....	60

- Abbildung 30: A) Konfokale Laserscanningmikroskopie der p65-Translokation in humanen Monozyten nach Stimulation für 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 und 240 min mit 100 ng/ml TSDiP (A) und für 30, 60 und 90 min mit 100 nM Pam3CSK4 (B); C) Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen für 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 und 240 min mit 100 ng/ml TSDiP stimulierter humaner Monozyten mittels ELISA 62
- Abbildung 31: Nachweis der ERK-, p38-, JNK-Phosphorylierung zu den Zeitpunkten 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 und 240 min nach Stimulation von Monozyten mit je 100 ng/ml MDP und TSDiP sowie 10 ng/ml LPS 63
- Abbildung 32: FACS-Analyse der mit phagozytosehemmenden (100 μ M MDC, 0,1 % Azid, 3 μ M CytD) und makropinozytosehemmenden Substanzen (1 μ M EIPA) für 30 min vorbehandelten und mit 10 FITC-gekoppelten Latexbeads/phagozytierende Zelle für 4 h inkubierten Monozyten 65
- Abbildung 33: Konfokale Laserscanningmikroskopie der mit phagozytose-hemmenden (100 μ M MDC, 0,1 % Azid, 3 μ M CytD) Substanzen für 30 min vorbehandelten und mit 10 FITC-gekoppelten Latexbeads/phagozytierende Zelle für 4 h inkubierten Monozyten 66
- Abbildung 34: Konfokale Laserscanningmikroskopie zur p65-Translokation der mit 1 μ M EIPA für 30 min vorinkubierten und mit 100 ng/ml TSDiP stimulierten Monozyten. Rot ist die NF κ -B-Untereinheit p65 dargestellt, blau sind die Nukleinsäuren gefärbt. 67
- Abbildung 35: Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 4 h stimulierter und für 30 min mit 3 μ M CytD vorinkubierter MNCs mittels ELISA 68
- Abbildung 36: Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 4 h stimulierter und für 30 min mit 100 μ M MDC vorinkubierter Monozyten mittels ELISA 68
- Abbildung 37: Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 4 h stimulierter und für 30 min mit 0,1 % Azid vorinkubierter Monozyten mittels ELISA 69
- Abbildung 38: Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 4 h stimulierter und für 30 min mit 1 μ M EIPA vorinkubierter Monozyten mittels ELISA 69
- Abbildung 39: Nachweis der ERK-, p38- und JNK-Phosphorylierung zu den Zeitpunkten 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 und 240 min nach Stimulation von Monozyten mit je 100 ng/ml MDP und TSDiP sowie 10 ng/ml LPS. Die Monozyten wurden vor der Stimulation mit 3 μ M der phagozytosehemmenden Substanzen Cyt D und 1 μ M der makropinozytosehemmenden Substanz EIPA für 30 min vorinkubiert..... 70
- Abbildung 40: ELISA-Bestimmung der TNF- α -Konzentration in Überständen 15, 30 und 60 min (A) und 5, 10 und 15 min (B) stimulierter Monozyten und anschließender Weiterinkubation mit purem Medium für bis zu 4 h 72
- Abbildung 41: Lokalisation von NOD2 (grün), CD14 (rot) und Nukleinsäuren (blau) in Monozyten mittels immunhistochemischer Färbungen und anschließender Detektion im konfokalen Laserscanningmikroskop 73
- Abbildung 42: Immunhistochemischer Nachweis von NOD2 (grün), Lysosomen (rot) und Nukleinsäuren (blau) in Monozyten im konfokalen Laserscanningmikroskop 74

Abbildung 43: Immunhistochemischer Nachweis von ER (grün), NOD2 (rot) und Golgiapparat (blau) in Monozyten im konfokalen Laserscanningmikroskop	75
Abbildung 44: Immunhistochemischer Nachweis von RIP2 (grün), NOD2 (rot) und Nucleinsäuren (blau) in Monozyten im konfokalen Laserscanningmikroskop	76
Abbildung 45: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit pcDNAdest47 NOD2 transient transfizierten HEK293-Zellen. Die grünen Signale detektieren die NOD2-GFPs.	76
Abbildung 46: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von mit pcDNAdest47 NOD2 transfizierten HEK293-Zellen (NOD2-GFP; grün). Der immunhistochemische Nachweis von NOD2 ist rot dargestellt, die Nucleinsäuren sind blau detektierbar	77
Abbildung 47: Immunhistochemischer Nachweis von NOD2 (grün) und Lysosomen (rot) in lebenden mit pcDNAdest47 NOD2 transfizierten HEK293-Zellen im konfokalen Laserscanningmikroskop.....	78
Abbildung 48: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von NOD2-GFP (grün) und mit BODIPY TRITC C ₅ -Ceramid (rot) gefärbten Membranen (Zellmembran, Zellkernmembran, Golgiapparatmembran) in mit pcDNAdest47-NOD2 transfizierten HEK293-Zellen	79
Abbildung 49: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von NOD2-GFP (grün) in mit pcDNAdest47 NOD2 transfizierten HEK293-Zellen zu den Zeitpunkten 0, 30, 60 und 75 min nach Stimulation mit 100 ng/ml TSDiP.....	80
Abbildung 50: mRNA-Arrays unstimulierter und mit 100 nM Pam3CSK4 für 4 h stimulierter Monozyten cDNA. Die x-fache Induktion der ansteigenden und absteigenden Genexpressionen nach Stimulation mit Pam3CSK4 sind tabellarisch dargestellt. Die am stärksten positiv und negativ regulierten Gene sind exemplarisch markiert	81
Abbildung 51: TNF- α -, IL-6- und IL-1 β -ELISAs der Überstände der für die mRNA-Arrays verwendeten Monozyten	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Tabelle der humanen Toll-like Rezeptoren 1-10 (TLRs) und ihrer bekannten Liganden	10
Tabelle 2:	Fluorochrom-konjugierte Antikörper bzw. Farbstoffe und deren eingesetzte Konzentrationen bei der immunhistochemischen Färbung für die konfokale Laserscanningmikroskopie	20
Tabelle 3:	Zusammenfassung der verwendeten primären und sekundären Antikörper für den Westernblot und deren Verdünungen.....	21
Tabelle 4:	Phagozytose- und Makropinzytosehemmer und deren eingesetzte Konzentrationen ...	23
Tabelle 5:	PCR-Primer-Sequenzen, Fragmentgrößen und <i>Annealing</i> -Temperaturen.....	24
Tabelle 6:	PCR-Bedingungen für die Amplifikation von Gensequenzen mit dem AccuPrime SuperMix I.....	31
Tabelle 7:	Zusammensetzung des PCR-Ansatzes zur Amplifikation der NOD2 CDS mittels der PfuUltra DNA-Polymerase.....	31
Tabelle 8:	PCR-Bedingungen für die Amplifikation der NOD2 CDS mit der DNA-Polymerase PfuUltra	32
Tabelle 9:	Verwendete Restriktionsenzyme und deren Inkubationszeiten sowie -temperaturen	33
Tabelle10:	Übersicht der verwendeten ELISAs und deren Bezugsquellen	38

Veröffentlichungen

Publikationen

- >> Inamura S., Y. Fujimoto, A. Kawasaki, Z. Shiokawa, E. Woelk, H. Heine, N. Inohara, S. Kusumoto, K. Fukase. Synthesis of peptidoglycan fragments and evaluation of their biological activities. **(2005)** (zur Publikation eingereicht)
- >> Woelk, E., P. Goroncy-Bermes, W. Sand. Influence of Storage on Monodispersed Cells of *Mycobacterium terrae* Used for Quantitative Carrier Test prEN 14563. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6932-6934 **(2003)**

Abstracts

- >> Woelk, E., S. Inamura, K. Fukase, S. Kusumoto, H. Heine. Cellular uptake of Peptidoglycan (PG) structures by pinocytosis is required for NOD2-induced p65 translocation. *Immunobiology* Vol. 210 Numbers 6-8 **(2005)**
- >> Woelk E., S. Inamura, U. Zähringer, K. Fukase, S. Kusumoto, A. J. Ulmer, H. Heine. Involvement of Cellular Uptake in the Immune Response towards Peptidoglycan structures by Intracellular Pattern Recognition Receptors. 1th Spring School on Immunology of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI), Ettal **(2005)**
- >> Woelk E., S. Inamura, U. Zähringer, K. Fukase, S. Kusumoto, A. J. Ulmer, H. Heine. Involvement of Phagocytosis in the Immune Response towards Peptidoglycan structures by Intracellular Pattern Recognition Receptors. *Immunobiology* Vol. 209 Numbers 4-6 **(2004)**
- >> Woelk E., S. Inamura, U. Zähringer, N. Reiling, K. Fukase, S. Kusumoto, A. J. Ulmer, H. Heine. Involvement of Intracellular Pattern Recognition Receptors in the Immune Response towards Peptidoglycan structures. *Clinical and Investigative Medicine* Vol. 27 No. 4 **(2004)**
- >> Woelk E., S. Inamura, U. Zähringer, N. Reiling, K. Fukase, S. Kusumoto, A. J. Ulmer, H. Heine. Not all macrophages are equal: peritoneal and bone-marrow derived macrophages of C57/BL6 mice respond differently to synthetic peptidoglycan structures. *Immunobiology* Vol. 208 Numbers 1-3 **(2003)**
- >> Woelk E., P. Goroncy-Bermes, W. Sand. Storage of Resuspended *Mycobacterium terrae*: Does it Influence the Results of the Quantitative Carrier Tests? *Book of Abstracts of the Fifth International Conference of the Hospital Infection Society*. Edinburgh **(2002)**

Vorträge

- 07/2004 **International Conference of Immunology (ICI)**, Montreal, Kanada
“Involvement of Intracellular Pattern Recognition Receptors in the Immune Response towards Peptidoglycan structures”
- 09/2003 **Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie**
(DGfI), Berlin
„Not all Macrophages are equal: Peritoneal and bone-marrow derived Macrophages of C57/BL6 mice respond differently to synthetic Peptidoglycan structures”

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name:	Woelk
Vorname:	Eva Maren
Geburtsdatum:	22.08.1976
Geburtsort:	Hamburg
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

08/1987 – 06/1996	Gymnasium Schenefeld, Schleswig-Holstein Abschluss: Abitur (2,2) >> Prüfungsfächer: Biologie, Kunst, Mathematik
08/1986 – 07/1987	Grundschule Altgemeinde Schenefeld, Schleswig-Holstein
08/1983 – 07/1986	Grundschule Südschule St. Ingbert, Saarland

Studium

07/2001 – 04/2002	Diplomarbeit bei der Fa. Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, zum Thema „Untersuchungen zur Wirksamkeit biozider Substanzen gegen Mykobakterien“
10/1996 – 05/2002	Studium der Biologie an der Universität Hamburg Abschluss: Diplom >> Schwerpunkte: Mikrobiologie, Molekularbiologie, Biochemie

Promotion

seit 09/2002	Promotion in der Arbeitsgruppe Angeborene Immunität im Forschungszentrum Borstel zum Thema „Erkennung und Aufnahme inflammatorisch aktiver synthetischer Peptidoglykanstrukturen“
--------------	--

Mitgliedschaften

seit 2003	Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI)
-----------	--

Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn **PD Dr. Holger Heine** für seine eingehende Betreuung, Beratung und intensive Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit. Seine stetige Diskussionsbereitschaft und seine konstruktiven Denkanstöße zu meiner Arbeit sowie seine verständnisvolle Art haben mir sehr geholfen.

Herrn Prof. Dr. **Koichi Fukase**, Herrn Prof. Dr. **Shoichi Kusumoto** und Herrn **Dr. Seiichi Inamura** von der *Graduate School of Science* der *Osaka-University*, Japan, danke ich für die Synthese und Bereitstellung der synthetischen Peptidoglykanstrukturen, ohne die die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Der gesamten Arbeitsgruppe Angeborene Immunität möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die wertvollen Gespräche danken. Herrn **Dr. Arnd Lentschat** und Frau **Jennifer Reiners** bin ich für die hilfreichen und konstruktiven Diskussionen sowie für die Durchsicht meiner Arbeit sehr zu Dank verpflichtet. Für ihre exzellente technische und ihre moralische Unterstützung möchte ich Frau **Ina Goroncy** und Frau **Katrin Sprenger** meinen ausdrücklichen Dank aussprechen. Frau **Dr. Maria Manoukian** danke ich für die Hilfestellung bei der Durchführung von Untersuchungen am konfokalen Laserscanningmikroskop.

Herrn **Prof. Dr. A. Jochen Ulmer**, Frau **Dr. Ute Buwitt-Beckmann** und Herrn **Dr. Dirk Albrecht** schulde ich großen Dank für die nützlichen und förderlichen Diskussionen und Gespräche während der letzten drei Jahre.

Für die erstklassige Assistenz und wertvolle Hilfe im Labor bin ich Frau **Patricia Prilla**, Frau **Carola Schneider** und nicht zuletzt Herrn **Suhad Al-Badri** sehr zu Dank verpflichtet.

Mein weiterer Dank gilt Herrn **Dr. Thomas Scholzen** und Herrn **Dr. Jörn Bullwinkel** für die unerschöpfliche Hilfestellung bei der Vorbereitung und Durchführung der konfokalen Laserscanningmikroskopie.

Frau **PD Dr. Ulrike Seitzer**, Herrn **Dr. Daniel Haller** sowie Frau **Dr. Ilka Schneider** danke ich für die Unterstützung bezüglich der Gateway-Technologie und für die Beantwortung meiner fortwährenden Fragen bezüglich der konfokalen Mikroskopie.

Für die Hilfestellungen am FACS sowie die Durchführung des *Sortens* bin ich Herrn **Dr. Martin Ernst** und Frau **Dr. Kathleen Marienfeld** zu Dank verpflichtet. Ferner gilt mein Dank Frau **Renate Bergmann** und Frau **Erika Kaltenhäuser** für die Beschaffung und Bereitstellung der Monozyten.

Herrn **Markus Lettau**, Herrn **Marten Jacob** und Herrn **PD Dr. Ottmar Janssen** aus dem Institut für Immunologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel danke ich für die unermüdliche, geistreiche und hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der Kinetiken am Laserscanningmikroskop.

Darüber hinaus möchte ich der **Deutschen Forschungsgemeinschaft** meinen Dank aussprechen, da sie durch die Vergabe eines Stipendiums im Rahmen des **Graduiertenkollegs 288** diese Arbeit ermöglichte.

Ganz besonderer Dank gilt meinen **Eltern** und meinem **Bruder Felix**, die mir stets mit Offenheit, guten Nerven und wertvollen Ratschlägen zur Seite standen. Ohne ihre unermüdliche Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau **Petra Hahnemann** danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft und aufmunternde Begleitung im Verlauf der letzten drei Jahre.

Nicht zuletzt möchte ich allen nicht genannten lieben **Freunden** für ihre verständnisvolle, bestätigende und abwechslungsreiche Begleitung während der gesamten Doktorarbeit danken. *Hamburg was lovely ...*

Danke Dan, es ist wunderbar ...
 dass es dich gibt ...

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine weiteren, als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Lübeck, 18. Oktober 2005

Eva Woelk