

Aus der Abteilung Neuropathologie

**(Prof. Dr. med. W. Brück)**

im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Dosisabhängige Aktivierung von  
Mikrogliazellen durch Toll-like - Rezeptoragonisten  
allein und in Kombination**

**INAUGURAL – DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Steffi Werner, geb. Bader**

aus

**Ueckermünde**

**GÖTTINGEN 2013**

**Dekan:** Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

**I. Berichtstatter:** Prof. Dr. med. R. Nau

**II: Berichtstatter/ in:** PD Dr. rer. nat. F. Lühder

**III. Berichtstatter/ in:** Prof. Dr. med. Oppermann

**Tag der mündlichen Prüfung:** 02.09.2013

---

## **Inhaltsverzeichnis**

|  |                  |
|--|------------------|
| <u>Inhaltsverzeichnis.....</u>   | <u>1</u>         |
| <b><u>1. Einleitung.....</u></b>   | <b><u>3</u></b>  |
| <i><u>1.1 Die innate Immunität.....</u></i>                                      | <i><u>3</u></i>  |
| <i><u>1.2 Toll - like - Rezeptoren .....</u></i>                                 | <i><u>5</u></i>  |
| <i><u>1.3 Struktur und Funktion spezifischer TLR - Liganden.....</u></i>         | <i><u>8</u></i>  |
| <i><u>1.3.1 LPS.....</u></i>   | <i><u>9</u></i>  |
| <i><u>1.3.2 Pneumolysin.....</u></i>   | <i><u>9</u></i>  |
| <i><u>1.3.3 CpG - Oligodesoxynukleotide.....</u></i>                             | <i><u>11</u></i> |
| <i><u>1.3.4 Pam3Cys.....</u></i>   | <i><u>12</u></i> |
| <i><u>1.3.5 Heat-killed Acholeplasma laidlawii (HKAL).....</u></i>               | <i><u>12</u></i> |
| <i><u>1.4 Die Rolle der TLR bei Entzündungen des ZNS .....</u></i>               | <i><u>12</u></i> |
| <i><u>1.4.1 Akute Entzündung des ZNS: Bakterielle Meningitis.....</u></i>        | <i><u>12</u></i> |
| <i><u>1.4.2 Chronischer Entzündungsprozess im ZNS: Morbus Alzheimer.....</u></i> | <i><u>14</u></i> |
| <i><u>1.5 Ziele.....</u></i>   | <i><u>15</u></i> |
| <b><u>2. Material und Methoden.....</u></b>                                      | <b><u>17</u></b> |
| <i><u>2.1. Verwendete Tiere.....</u></i>   | <i><u>17</u></i> |
| <i><u>2.2 Primäre murine Mikrogliaulturen.....</u></i>                           | <i><u>17</u></i> |
| <i><u>2.2.1 Primärkultur.....</u></i>  | <i><u>17</u></i> |
| <i><u>2.2.2 Sekundärkultur.....</u></i>  | <i><u>18</u></i> |
| <i><u>2.3 Stimulation der Mikroglia mit TLR - Agonisten.....</u></i>             | <i><u>20</u></i> |
| <i><u>2.3.1 TLR2 - Agonisten: Pam3Cys und HKAL.....</u></i>                      | <i><u>20</u></i> |
| <i><u>2.3.2 TLR4 - Agonisten: Pneumolysin und LPS.....</u></i>                   | <i><u>21</u></i> |
| <i><u>2.3.3 TLR9 - Agonist: CpG.....</u></i>                                     | <i><u>21</u></i> |
| <i><u>2.4 Quantifizierung der Stimulation und Vitalitätstests.....</u></i>       | <i><u>22</u></i> |
| <i><u>2.4.1 Nitritmessung.....</u></i>   | <i><u>22</u></i> |
| <i><u>2.4.2 TNF-<math>\alpha</math> - Messung.....</u></i>                       | <i><u>23</u></i> |
| <i><u>2.4.3 Isolectin-B4 - Färbung.....</u></i>                                  | <i><u>24</u></i> |
| <i><u>2.4.4 WST-1 - Test.....</u></i>  | <i><u>24</u></i> |
| <i><u>2.5 Statistik.....</u></i>   | <i><u>25</u></i> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3. Ergebnisse.....</b>  | <b>26</b> |
| 3.1 Morphologische Veränderungen.....                                  | 26        |
| 3.2 Dosis - Wirkungs - Kurven für die NO - Freisetzung.....            | 28        |
| 3.3 Dosis - Wirkungs - Kurven für die TNF- $\alpha$ - Freisetzung..... | 30        |
| 3.4 Relative stimulatorische Potenz.....                               | 31        |
| 3.5 NO - Freisetzung nach maximaler Stimulation.....                   | 33        |
| 3.6 NO - Freisetzung nach Costimulation mit zwei TLR - Agonisten.....  | 35        |
| 3.7 Immunstimulatorische und zytotoxische Effekte von Pneumolysin..... | 37        |
| 3.8 NO - Freisetzung durch TLR4 - defiziente Mikrogliazellen .....     | 40        |
| <b>4. Diskussion.....</b>  | <b>41</b> |
| <b>5. Zusammenfassung .....</b>  | <b>48</b> |
| <b>6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>                     | <b>50</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis.....</b>                                    | <b>51</b> |
| <b>8. Abkürzungsverzeichnis.....</b>                                   | <b>66</b> |

## 1. Einleitung

### 1.1 Die innate Immunität

Die Immunität ist die Fähigkeit eines Organismus, den Angriff von Mikroorganismen abzuwehren und somit ein Eindringen von Bakterien, Pilzen, Protozoen oder Viren in den Körper zu verhindern. Wurde in vergangenen Zeiten gewöhnlich zwischen spezifischer und unspezifischer Immunität unterschieden, passt sich die heutige Nomenklatur der Tatsache an, dass in der früher als unspezifisch bezeichneten Art der Erregerbekämpfung nach neueren Erkenntnissen sehr wohl auch erregerspezifische Strukturen erkannt werden können. Die heute übliche Differenzierung erfolgt daher in "angeborene" oder auch "innate" Immunität und "erworbene" Immunität.

Nur der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle die erworbene Immunität erwähnt, da deren Effektorzellen teilweise auf die Signale aus dem innaten System angewiesen sind.

Die Hauptzellen der erworbenen Immunität sind die Lymphozyten, die durch Bildung einer enormen Zahl von rekombinanten Rezeptoren - den Immunoglobulinen und den T-Zell-Rezeptoren - in der Lage sind, jedes Antigen zu erkennen, dem der Körper jemals ausgesetzt gewesen ist. Das adaptive Immunsystem ist phylogenetisch jünger als das angeborene. Das angeborene kann das erworbene Immunsystem sowohl in seinen Aufgaben unterstützen als es auch kontrollieren. (Kimbrell & Beutler 2001).

Die angeborene Abwehr der Säugetiere beruht neben der Ausbildung physikalischer und chemischer Barrieren darauf, dass Bakterien, Viren oder Protozoen bestimmte Merkmale haben, die durch die immunkompetente Zelle sofort erkannt werden können. Diese Merkmale bestehen aus besonderen Mustern, im Englischen "*pattern*" genannt. Es handelt sich um Immunreaktionen hervorrufende Antigenstrukturen von Mikroorganismen.

Am besten erforscht ist das Komplementbindungssystem, das nicht Thema dieser Arbeit ist und daher nicht ausführlich beschrieben werden soll. In den letzten Jahren widmete sich die Forschung auf dem Gebiet des innaten Immunsystems mehr und mehr der Superfamilie der Interleukin- und Toll - like - Rezeptoren (TLR) und ihrer Bedeutung in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Auswirkung bakterieller und synthetisch hergestellter Agonisten für TLR2, TLR4 und TLR9 sowie deren Bedeutung für die Auslösung und Unterhaltung von akuten sowie chronischen Entzündungsreaktionen im zentralen Nervensystem (ZNS).

TLR befinden sich auf der Oberfläche oder am endoplasmatischen Retikulum von Makrophagen und anderen phagozytierenden Zellen. Makrophagen sind Zellen der angeborenen Immunität, spielen aber auch eine wichtige Rolle als Effektorzellen der erworbenen Abwehr. Sie leiten sich von den Monozyten des Blutes ab und kommen als ortsständige Bindegewebszellen fast in allen Körpergeweben vor. So gibt es in der Leber die Kupfferschen Sternzellen, in der Haut die Langerhanszellen, im Knochen die Osteoklasten, im Knorpelgewebe Chondroblasten und im ZNS die Mikrogliazellen. In Bau und Funktion existieren erhebliche Differenzen, sind doch in den verschiedenen Organen unterschiedliche Aufgaben zu erfüllen. Allen Makrophagen gemeinsam jedoch ist die Fähigkeit der Phagozytose. Kupffersche Sternzellen, Langerhanszellen und Mikroglia dienen in allererster Linie der Abwehr von Krankheitserregern und der Produktion von Entzündungsmediatoren in den verschiedenen Organen des Organismus, wodurch weitere Abwehrzellen rekrutiert werden können und eine adäquate Entzündungsreaktion überhaupt erst möglich wird.

Entzündung bedeutet für einen Säugetierorganismus zweierlei: Sicherung des Überlebens einerseits, Inkaufnahme körperlichen Schadens durch die eigene Abwehr andererseits. Die Auseinandersetzung des säugetiereigenen Abwehrsystems mit Mikroorganismen als Überlebensstrategie stellt eine enorme Herausforderung dar. Dabei gilt es, die Dosis der notwendigen, leider nicht immer nur für Fremdzellen toxischen Abwehrreaktion mit dem geringsten Schaden für den Gesamtorganismus zu finden. Dass dieses Verhältnis nicht immer richtig ausbalanciert ist, ist sowohl die Voraussetzung für Krankheiten, die nicht erregerebedingt entstehen, als auch für die manchmal überschießende Reaktion auf eigentlich eher harmlose Erreger oder gar körpereigene Eiweiße.

Die intrazellulären Abläufe eines Entzündungsvorganges müssen noch besser verstanden sein, um adäquatere Methoden der Heilung für erregerebedingte und autoimmune Erkrankungen zu finden. Diese Arbeit soll zum Verständnis von Vorgängen des innate Immunsystems im ZNS beitragen. Besondere Beachtung findet die Auswirkung bakterieller Bestandteile, die im Rahmen einer Meningitis freigesetzt werden, auf die Hauptzellen der innate Immunität des Gehirnes, die Mikrogliazellen.

Mikrogliazellen wurden 1932 erstmals nach Silber - Carbonat - Färbungen von Hirnpräparationen als Zellen mit langen, verzweigten Fortsätzen lichtmikroskopisch dargestellt und beschrieben (del Rio-Hortega 1932). Die Mikrogliazellen stellen einen 5%- bis 20%igen Anteil der gesamten glialen Zellpopulation des ZNS dar (Streit & Kincaid-Colton 1995; Perry & Gordon 1988). Lange Zeit ist ihre Abstammung von den Monozyten des Blutes kontrovers diskutiert worden, inzwischen ist jedoch die vorherrschende Meinung, dass Monozyten

während der embryonalen Entwicklung das Gehirn besiedeln und sich dort in Mikrogliazellen differenzieren (Ling & Wong, 1993). Dies ist anzunehmen, weil neben der ähnlichen Funktion auf der Zelloberfläche von Monozyten, Mikrogliazellen und anderen Makrophagen folgende Rezeptoren zu finden sind: CD11b, CD11c, CD45 (Leukozyten-spezifisches Antigen), CD64 (FC $\gamma$ -Rezeptor), MHC - Klasse - 1 und MHC - Klasse - 2 (Thomas 1992; McGeer et al. 1993; Kreutzberg 1996). Ebenso kann die Tatsache, dass Vorläuferzellen der Monozyten die Fähigkeit haben, während einer Infektion das ZNS zu besiedeln und sich dort zu voll differenzierten Mikrogliazellen zu entwickeln, als Hinweis auf die Abstammung bewertet werden (Simard & Rivest 2004, Djukic et al. 2006). Neuere Studien weisen auf die Entwicklung einer Subpopulation im Blut zirkulierender Monozyten (Ly-6Chi) zu Mikrogliazellen während einer Beeinträchtigung der Blut - Hirn - Schranke hin (Mildner et al. 2007).

Mikrogliazellen erfüllen neben ihrer Funktion als Phagozyten des ZNS weitere Aufgaben, so sezernieren sie potentiell zytotoxische Substanzen wie Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid (NO), Proteasen und proinflammatorische Zytokine (Banati & Kreutzberg 1993). Bei den proinflammatorischen Zytokinen handelt es sich z.B. um Interleukine und TNF- $\alpha$ , sie können im ZNS zytotoxische oder zytopathische Effekte auslösen (Dickson et al. 1993).

## **1.2 Toll - like - Rezeptoren**

Ihren Namen erhielten diese Proteine, weil sie Homologe des zunächst in der Drosophila entdeckten Rezeptors "Toll" sind. Inzwischen konnte die Verbindung der analogen Kaskaden zwischen Insekt und Säugetier nachgewiesen werden (Medzhitov et al. 1998;). Aktuell sind 13 Mitglieder (TLR 1-13) charakterisiert worden, für die in den letzten Jahren viele Liganden gefunden wurden (Tabeta et al. 2004). Unterschiede finden sich bei den verschiedenen Rezeptoren sowohl im strukturellen Aufbau als auch in der Affinität zu bestimmten Liganden. So binden beispielsweise Lipopeptide und Teichonsäure als Bestandteile Gram - positiver Bakterien sowie Tripalmitol - S - Glyceryl - Cysteine - OH (Pam<sub>3</sub>Cys) als synthetisch hergestellter Agonist an TLR2. Doppelsträngige virale RNA interagiert mit TLR3 (Sarkar et al. 2003). TLR4 hingegen zeigt Affinität zu Lipopolysacchariden (LPS), die in Gram - negativen Bakterien vorkommen (Tapping et al 2000; Malley et al. 2003). Auch Pneumolysin von *S. pneumoniae* aktiviert TLR4 (Malley et al. 2003). Flagellin als Teil der Flagellaten und bestimmter Bakterien ist Agonist an TLR5 (Hayashi et al. 2001). Bakterielle DNA - Bestandteile aktivieren dagegen TLR9, weil sie im Vergleich zu Säugetierzellen einen 20fachen

Gehalt an unmethylierten Cytosin - Phosphat - Guanosin - Nukleotiden (CpG) haben (Krieg et al. 1995; Wagner 1999, Hemmi et al. 2000, Takeshita S et al. 2001, Takeshita F et al 2001). TLR1 und TLR6 wirken nur in Verbindung mit TLR2 als Corezeptor (Hajjar et al. 2001; Ozinsky et al. 2000). Die Aktivierung der TLR, mit Ausnahme von TLR3, löst über unterschiedliche Wege letztendlich ähnliche Wirkungen an der Zelle aus, die den Effekten von IL-1 und anderen Interleukinen ähneln. Dies liegt daran, dass sich die Signalwege am Protein MyD88, einem löslichen intrazellulärem Adapterprotein, treffen, obgleich daneben ein MyD88-unabhängiger Weg der Signaltransduktion durch TLR existiert. TLR3 benötigt als Cofaktor TRIF. Dieses Molekül kann in Verbindung mit TRAM auch als Cofaktor für TLR4 fungieren (O'Neill 2003).

TLR gehören der IL-1R / TLR - Superfamilie an, deren Mitglieder mindestens eine TIR - Domäne besitzen. Dies ist ein etwa 200 Aminosäuren langer Abschnitt, der drei konservierte Sequenzmotive enthält. (Xu et al. 2000; O'Neill & Greene 1998).

Die IL-1R / TLR Superfamilie untergliedert sich in zwei Subklassen. Die TLR werden der Subklasse 2 zugerechnet. Sämtliche Rezeptoren, die der Subklasse 2 angehören, besitzen ein "Leucinreiches Motiv" (LRM), das vermutlich der Antigenerkennung dient. Sie bilden entweder Homodimere, wie z.B. TLR9, oder Heterodimere, wie TLR2 mit TLR1 oder TLR6. Die Subklasse 2 wird auch als TLR - Familie bezeichnet, deren Mitglieder in Säugetier-, Insekten- und Pflanzenzellen zu finden sind. (Aderem & Ulevitch 2000, Bowie & O'Neill 2000)

Bemerkenswert ist die erstaunliche Ähnlichkeit von Aufbau und Funktion der TLR in Tier- und Pflanzenreich sowie der dazugehörigen Signalkaskaden, ein Beweis des hohen phylogenetischen Alters dieses Teils der angeborenen Immunität, aber auch der Konservierung bestimmter Antigenstrukturen von Erregern durch die Evolution hindurch.

Da sich diese Arbeit mit Aktivitäten an TLR2, TLR4 und TLR9 von Säugetieren befasst, sei deren Struktur und Wirkungsweise genauer erläutert.

D. H. Wyllie et al. wiesen im Jahr 2000 als erste nach, dass TLR2 nach Ligandenbindung funktionelle Dimere mit TLR1 oder anderen Rezeptoren bildet, was jeweils unterschiedliche Signalwege nach sich zieht. TLR2 kann allerdings auch als Homodimer fungieren. Inzwischen gilt die Bildung von Heterodimeren zwischen TLR2 mit TLR6 ebenfalls als gesichert (Akira & Sato 2003). Die entsprechenden Dimere interagieren mit dem Protein CD14. Dieses Protein besitzt ebenso wie die TLR Leucin-reiche Abschnitte und wird durch die Mikrogliazelle in den Extrazellularraum sezerniert, um dann an die Zellmembran zu binden. Die Verankerung des Proteins in der Membran ist durch Glykosylphosphatidyl gewährleistet, ihm fehlt jedoch eine Transmembrandomäne, was erklärt, dass Ligandenbindung an CD14 allein keine



Signaltransduktion nach sich zieht. Neben der beschriebenen Variante kommt CD14 auch in löslicher Form im Serum vor.

LPS als Zellwandbestandteil Gram - negativer Bakterien wird durch das LPS - Bindungsprotein (LBP) opsoniert, so dass LPS sich mit CD14 verbinden kann. LBP ist ein 60 kDa großes, in der Leber produziertes zirkulierendes Protein, welches in der Akute - Phase - Immunantwort ansteigt (Kimbrell & Beutler 2001; Schumann et al. 1990). In Anwesenheit von LBP kann durch LPS die Barrierefunktion des Endothels beeinträchtigt werden (Bannerman & Goldblum 1999). Der LBP / LPS / CD14-Komplex vermag TLR4 zu aktivieren (Hoshino et al. 1999). TLR4 benötigt als Cofaktor ein Protein namens MD-2. Dies ist ein Protein, welches von Monozyten und dendritischen Zellen sezerniert wird und aus durch Disulfidbrücken verbundenen Oligomeren besteht (Yang et al. 2000). MD-2 ist mit dem extrazellulären Bestandteil von TLR4 verbunden. Nur in dieser Verbindung kommt eine Interaktion zwischen CD14 und LPS zustande (Aderem & Ulevitch 2000).

Eine Bindung von Liganden an die extrazellulären Domänen von TLR2 oder TLR4 bewirkt die Rekrutierung des Adapterproteins MyD88 an den Rezeptorkomplex. MyD88 enthält zwei Domänen. So existiert eine C-terminale Toll - homologe Domäne, die mit der Toll - homologen Domäne des Rezeptors Verbindung aufnimmt. Daneben gibt es eine Todesdomäne, die mit den Todesdomänen der IL-1R - assoziierten Serin - Threonin - Kinasen IRAK1 und IRAK4 interagieren kann, was die Bindung von MyD88 an IRAK1 und IRAK4 ermöglicht (Xu et al. 2000). Dabei wird IRAK4 aktiviert und leitet die Hyperphosphorylierung und damit Aktivierung von IRAK1 ein. IRAK1 wiederum kann nun mit TRAF6 (*Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor*) Kontakt aufnehmen. Der Verbund IRAK4 / IRAK1 / TRAF6 ändert nun seine Konformation und verlässt den Rezeptorkomplex, um mit dem membrangebundenen Protein TAB2 zu interagieren. TAB2 ist assoziiert mit TAK1 und TAB1. Unter Verlust von IRAK4 und IRAK1 bewegt sich dann der TAB2 / TAK1 / TAB1 / TRAF6 - Komplex ins Zytosol. Hier wird TAK2 aktiviert und leitet einerseits die Aktivierung von IKK, andererseits die von MAP - Kinasen (p38, ERK, JNK) ein. Die MAP - Kinasen sind für eine AP-1 - Aktivierung verantwortlich. IKK wiederum bewirken die Phosphorylierung von IκBs, einem Inhibitor von Nf-κB. IκBs löst sich von Nf-κB. Dieser Transkriptionsfaktor kann nun in den Zellkern wandern und führt dort zur Induktion verschiedener Gene, so dass es letztendlich als Effekt der Ligandenbindung an TLR zu einem intrazellulären Anstieg von verschiedenen Entzündungsmediatoren kommt (zusammengefasst von Akira & Sato 2003). So steigt zum Beispiel die TNF-α - Produktion in der Zelle an, was wiederum zum Anstieg von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen und von IL-6 führt. Weiterhin steigt als Effekt der NF-

$\kappa$ B - und AP-1 - Aktivierung die Konzentration folgender Substanzen an: IL-12, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-1, IL-10, MHC-I, CD40, CD86, CD69 (Bremner & Heinrich 2002). 2004 konnte die direkte Bindung von CpG - DNA an TLR9 dargestellt werden, diese findet im Zytosol, genauer am Endoplasmatischen Retikulum (ER) statt, was im Gegensatz zum Aktivierungsmechanismus von TLR2 und TLR4 an der Zelloberfläche steht (Latz et al. 2004). Vorher war anhand von TLR9 - *Knock-out* - Mäusen die Wirksamkeit von bakterieller CpG an TLR9 nachgewiesen worden (Hemmi et al. 2000). Außerdem war die Abhängigkeit der stimulatorischen Aktivität bakterieller CpG - DNA von ihrer Mobilität bekannt (Manzel & Macfarlane 1999). Neuere Studien sprechen dafür, dass CpG - DNA über die clathrinabhängige Endozytose in die Zelle aufgenommen wird und schnell in ein tubuläres lysosomales Kompartiment gelangt. TLR9, im ER exprimiert, und MyD88 bewegen sich nach Stimulation auf Anhäufungen von CpG zu und interagieren mit dem CpG - haltigen lysosomalen Kompartiment (Latz et al. 2004).

Neben der MyD88 - abhängigen Kaskade existiert auch ein von MyD88 unabhängiger Effekt. Hier kommt es über ein Protein namens IRF-3 zu einer Aktivierung von Interferon-induzierenden Genen, z.B. dem CXC - Chemokin IP10. Besonders bedeutsam ist die MyD88 - unabhängige Signalübertragung für TLR3 über das Protein TRIF, dem ähnlich wie MyD88 eine Funktion als Adapter zwischen TLR und anderen Proteinen zukommt. Überexpression von TRIF, nicht jedoch die von MyD88, führte zu einer Aktivierung des Promotors von Interferon- $\beta$ . Der MyD88 - unabhängige Weg führt also eher zu einer Induktion von Interferonen, der MyD88 - abhängige zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen (Akira & Sato 2003).

### **1.3 Struktur und Funktion spezifischer TLR - Liganden**

Im Rahmen der bakteriellen Meningitis kommt es im Säugetierorganismus zur Entzündungsreaktion. Bakterien weisen unterschiedliche Strukturen in der Zellwand, im Nucleoid oder im Zytosol auf, die Angriffspunkte des Abwehrsystems darstellen können. Diese Strukturen werden, wenn sich Antikörper und bestimmte Lymphozytenrezeptoren spezifisch an sie binden, Antigene genannt. Von einigen dieser Moleküle ist bekannt, dass sie spezifisch mit einem Mitglied der TLR - Familie reagieren. Des besseren Verständnisses der molekularbiologischen Vorgänge wegen sei hier kurz der Aufbau der verwendeten rezeptorspezifischen Antigene LPS, Pneumolysin, CpG, Pam<sub>3</sub>Cys und HKAL beleuchtet. HKAL steht für "*Heat killed Acholeplasma laidlawii*".

### 1.3.1 LPS

LPS kommen in der Zellwand Gram - negativer Bakterien vor. Synonym zu "LPS" wird häufig der Begriff "Endotoxin" verwendet, weil diese Art Antigen Bestandteil des Bakteriums selbst ist. Die LPS - vermittelte Immunantwort wird in erster Linie indirekt durch Immunmodulatoren wie TNF- $\alpha$ , Interleukinen oder Interferon- $\alpha$  hervorgerufen. Diese Mediatoren werden hauptsächlich durch Makrophagen und Monozyten, aber auch von Epithel- oder Mastzellen produziert. Die Bandbreite der existierenden unterschiedlichen Endotoxine ist groß, allen ist aber eine prinzipiell ähnliche Struktur gemeinsam. Es handelt sich bei den Endotoxinen um amphiphile Moleküle, welche in ihrer Struktur einen hydrophilen Polysaccharidanteil und eine kovalent gebundene hydrophobe Lipidkomponente, genannt Lipid A, aufweisen. Der Polysaccharidanteil kann wiederum in zwei Subdomänen unterteilt werden, nämlich in die sogenannte *Core* - Region und in eine o-spezifische Kette. Letztere besteht aus einer Sequenz sich wiederholender Einheiten identischer Oligosaccharide, die die serologische Spezifität des LPS und damit auch die des Bakteriums bestimmen (Lüderitz et al. 1978; O'Neill & Greene 1998). Die Lipid-A-Komponente setzt sich aus einem phosphorylierten  $\beta$  1, 6-gebundenen D-Glukosaminosaccharid mit sechs oder sieben Säureresten zusammen. Es kommen Variationen in Länge, Anzahl und Positionen der Fettsäuren vor. Lipid A bildet den eigentlich toxischen Anteil des LPS, die biologischen Effekte des LPS können durch freies Lipid A oder durch synthetisch hergestellte Homologe reproduziert werden (Ulmer et al. 1992).

### 1.3.2 Pneumolysin

*Streptococcus pneumoniae* ist ein Gram - positives Bakterium, dem als Erreger mehrerer auch im Zeitalter moderner Antibiotika potentiell tödlicher Erkrankungen eine wichtige Bedeutung zukommt. Durch potente Virulenzfaktoren wie Cholin - bindendes Protein A, Pneumokokken - Oberflächen-Antigen, Neuraminidase A und B, Autolysin oder Hyaluronatlyase ist er ein potentiell äußerst pathogener Mikroorganismus. Neben den genannten Antigenen, die sich alle auf der Oberfläche der Pneumokokken befinden, existiert im Zytosol das lösliche Pneumolysin, ein 53 - kDa - großes Protein, das von allen klinischen Formen des Krankheitserregers produziert wird (Paton et al. 1983, Paton et al 1986, Paton et al 1993). Pneumolysin kann aus der Zelle freigesetzt werden, dieser Vorgang wird durch das Oberflächenprotein Autolysin eingeleitet. Pneumolysin werden mehrere unterschiedliche Funktionen zugesprochen, besonders in der frühen Phase der Pneumokokkeninfektion. So erleichtert es das Eindringen des

Krankheitserregers in das Respirationsepithel, indem es die Ziliarzellen schädigt (Rayner et al. 1995). Die zytotoxischen Effekte des Pneumolysins inhibieren Phagozyten und andere Immunzellen, was zur Immunsuppression des Wirtes führt. Pneumolysin wird den Cholesterol-abhängigen Zytolysinen (CDC) zugerechnet. Die CDC binden an das Cholesterol der Wirtszellmembran und verschmelzen mit dieser, um dort relativ große Poren zu bilden. Die Wirtszelle stirbt, einer ausreichend hohen Dosis eines CDCs ausgesetzt, ab. Den CDC verschiedener Bakterien liegt eine ähnliche Struktur zugrunde. Sie kommen entweder in wasserlöslicher Form, in cholesterolgebundener Form oder in cholesterolmembrangebundener Form vor. Die wasserlösliche Form liegt gewöhnlich in Monomer- oder Dimerform vor, die Dimerisierung erfolgt vermutlich in der Cholesterolbindung (Kelly & Jedrzejak 2000). Während der Einbettung in die Lipiddoppelschicht der Membran bilden sich große Oligomere aus 30 - 50 Monomeren (Rubins & Janoff 1998). Pneumolysin besteht aus vier Domänen, von denen die vierte, eine hochkonservierte und viel Tryptophan enthaltende Schleife, für die Cholesterolbindung verantwortlich zeichnet (Rossjohn et al. 1998). In diesen Prozess ist auch die erste Domäne des Pneumolysins eingebunden. Neuere Studien zeigen, dass bestimmte Regionen des Pneumolysin - Monomers ihre strukturellen Konformationen ändern, was zur Bildung eines hydrophilen Anteils während der Cholesterolbindung führt, wahrscheinlich in Domäne vier. Die Moleküle lagern sich nun zu Ringstrukturen zusammen und bilden Poren, welche zur Störung der elektrolytgerichteten osmotischen Balance zwischen Intra- und Extrazellulärraum und letztendlich zur Lyse der Zelle führen (Jedrzejak 2001). Pneumolysin ist ein Virulenzfaktor von *S. pneumoniae* und bindet an das Cholesterol der Zellmembran von Wirtszellen, verbindet sich dort zu Oligomeren und bildet Poren in der Membran, was zur Zerstörung der Zelle führt (Malley et al. 2003). Pneumolysin bindet daneben an den Fc - Teil von Immunglobulin G (IgG), dadurch wird über den klassischen Weg das Komplementsystem aktiviert. Dies führt zu einer vermehrten und ungezielten Aktivierung der Komplementkaskade, was eine verminderte Konzentration an bindungsfähigen Komplementmolekülen im Serum zur Folge hat (Watson & Musher 1990, Alcantara et al. 2001). Die verminderte Konzentration von Komplement bedingt eine geringere Opsonierung von Bakterien und damit eine geringere Phagozytose durch Granulozyten und damit ein Umgehen der körperlichen Abwehr. Eine Aktivierung der p38 - MAPK - Signalkaskade durch Pneumolysin und eine Auslösung der Apoptose in Zielzellen wurde beschrieben (Stringaris et al. 2002). Durch Pneumolysin wird die Proliferation und die Antikörperbildung der Lymphozyten sowie die antibakteriellen Reaktionen von Makrophagen gehemmt (Billington et al. 2000). Neben der Zellzerstörung hat Pneumolysin, niedrig dosiert, eine immunstimulatorische Wirkung. Malley und seine

Mitarbeiter wiesen 2003 nach, dass Pneumolysin während der Pneumokokken - Infektion in subletaler Konzentration TLR4 aktiviert. In sublytischen Konzentrationen hemmt Pneumolysin die Funktion von Phagozyten und Lymphozyten, aus Monozyten kann es IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  freisetzen (Watson et al. 1995).

### **1.3.3 CpG - Oligodesoxynukleotide**

Bakterielle DNA enthält unmethylierte 2-Desoxyribol - (Cytosin - Phosphat - Guanosin) - Dinukleotide, flankiert von spezifischen DNA - Sequenzen, deren Strukturen durch TLR9 erkannt werden. Wir benutzten in dieser Arbeit ein synthetisch hergestelltes Analogon. Der Einsatz von CpG - ODN bewirkt eine TH1 - dominierte Immunantwort, besonders durch die Hochregulation von IL-12. Dabei zeigen die TLR9 verschiedener Säugetiere Spezifität für verschiedene CpG - Motive. So bevorzugt zum Beispiel der murine TLR9 CpG - Dinukleotide, die am 5'-Ende von zwei Purinbasen und am 3'-Ende von zwei Pyrimidinbasen flankiert sind, wie "GACGTT" (Krieg et al. 1995). Menschliche Immunzellen reagieren dagegen stärker auf "CTCGTT"- und "TTCGTT"-Motive (Bauer et al. 2001), wohingegen das Palindrom "AACGTT" sowohl in der Maus als auch im Menschen starke Immunantworten induziert (Van Uden & Raz 2000). Dabei ist die Sequenz am 5'-Ende des CpG - Dinukleotides entscheidender für die Erkennung und die Bindung durch TLR9 als die Sequenz am 3'-Ende. Ein frei zugängliches 5'-Ende ist für die Aktivierung des Rezeptors unabdingbar. Ist es mit einem größeren Liganden, z.B. einem Tetramer - Oligonukleotid, konjugiert, wird die Aktivierung von TLR9 unterdrückt (Kandamilla et al 2002). Interessanterweise induzieren 3' -3' - verbundene CpG - DNA, auch Immunomere genannt, eine höhere und etwas veränderte Zytokinsekretion (Yu et al. 2002). Immunomere verfügen über zwei 5'-Enden, ein Umstand, der möglicherweise eine wesentlich schnellere Bindung und TLR9 - Dimerisierung zur Folge hat und die Kinetik der NF- $\kappa$ B - Aktivierung verändern mag (Kandamilla et al. 2003). Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass ein einfacher Basenaustausch in stimulierender CpG - DNA deren Wirkung umkehrt. Statt einer Stimulierung der TH1-Antwort wurde eine Immunsuppression beobachtet (Ho et al. 2003, Krieg et al. 1998). Anders als TLR2 - und TLR4 - Liganden interagiert bakterielle CpG - DNA nicht an der Zelloberfläche, sondern intrazellulär am ER mit seinem Rezeptor, wie im Kapitel 1.2. schon erläutert (Latz et al. 2004).

### **1.3.4 Pam<sub>3</sub>Cys**

Pam<sub>3</sub>Cys steht als Abkürzung für Tripalmitol - S - glycerilcysteinyll. Es handelt sich um Analoge aus N-terminalen Lipopeptiden von *Escherichia coli*. Dort stellt Pam<sub>3</sub>Cys den biologisch aktiven Teil der Lipoproteine dar. Lipoproteine sind Bestandteile sowohl Gram - positiver als auch Gram - negativer Bakterien und besitzen die gleichen N-terminalen Glyceryl - Cystein - Reste mit drei Fettsäureketten: Eine ist amidgebunden, die anderen beiden besitzen eine Esterbindung zu dem 2,3-Dihydroxypropylrest des Cysteins. Diese Struktur ist ebenfalls im synthetisch hergestellten Pam<sub>3</sub>Cys enthalten (Seifert et al.1990, Hoffmann et al. 1988). Seit langem ist bekannt, dass Pam<sub>3</sub>Cys -Verbindungen Makrophagen und B-Lymphozyten aktivieren können (Hoffmann et al. 1988), seit einer relativ kurzer Zeit jedoch weiß man, dass die Wirkung von Lipoproteinen auf eine Interaktion mit TLR2 zurückzuführen ist (Hertz et al. 2001). Weil Pam<sub>3</sub>Cys synthetisch hergestellt wird, treten keine Verunreinigungen mit anderen TLR - Agonisten, z.B. LPS, auf.

### **1.3.5 Heat-killed *Acholeplasma laidlawii* (HKAL)**

*Acholeplasma laidlawii* zählt zu den Mykoplasmen, also zu den zellwandlosen Bakterien. Aliprantis et al. zeigten 1999, dass HKAL ein spezifischer Agonist von TLR2 ist.

## **1.4 Die Rolle der TLR bei Entzündungen des ZNS**

Entzündungen des ZNS können unterschiedliche Ursachen haben. Sie treten akut oder chronisch auf. Erreger wie Bakterien, Pilze, Viren oder Prionen lösen ebenso wie Traumata, Ischämien oder körpereigene Bestandteile Entzündungsreaktionen im ZNS aus. Aus der Vielzahl möglicher Ursachen wird im Folgenden auf die akute Entzündung am Beispiel der bakteriellen Meningitis und auf den chronisch - entzündlichen Prozess am Beispiel der Alzheimer - Erkrankung näher eingegangen.

### **1.4.1 Akute Entzündung des ZNS: Bakterielle Meningitis**

Abhängig vom Lebensalter der Patienten, existieren unterschiedliche bakterielle Erreger der Meningits. So kommt es z.B. bei Neugeborenen in erster Linie zur Hirnhautentzündung durch B-Streptokokken oder *Escherichia coli*. Bei Kindern - heute glücklicherweise durch Impfschutz

seltener geworden - ist *Haemophilus influenzae* ein bedeutender Meningitiserreger. Der erwachsene Mensch ist durch *Streptococcus pneumoniae* (Synonym: Pneumokokken) oder durch *Neisseria meningitidis* (Synonym: Meningokokken) gefährdet.

Auch sechzig Jahre nach ihrer Entwicklung kommen als kausal wirksames Mittel gegen bakteriell verursachte Meningitiden in allererster Linie die Antibiotika zum Einsatz. Behandelte Neugeborene können in 20–30 % der Fälle an einer bakteriellen Meningitis versterben. Das Mortalitätsrisiko liegt bei älteren Kindern deutlich geringer bei nur etwa 2 %. Im Erwachsenenalter steigt es wieder auf etwa 19–37 % an. Die Letalität einer behandelten bakteriellen Meningitis hängt unter anderem von Alter und Allgemeinzustand des Patienten sowie vom Erreger ab. Die Prognose einer durch *Haemophilus influenzae* oder *Neisseria meningitidis* verursachten Meningitis ist besser als die durch B-Streptokokken, coliformen Erregern oder *Streptococcus pneumoniae*. Meningokokkenmeningitiden (Mortalität 3 - 7 %) verlaufen beim Erwachsenen günstiger als Pneumokokkenmeningitiden (Saez-Llorenz & McCracken 2003, van de Beek et al. 2006). Ergänzend zur Antibiotikatherapie wären daher wirksame Behandlungsmethoden, möglicherweise solche, die die TLR - Signalkaskade beeinflussen, wünschenswert .

Die meisten bakteriellen Meningitiserreger kolonisieren in den Schleimhäuten von Nasopharynx (z.B. Meningokokken, Pneumokokken, *H. influenzae*) oder des Gastrointestinaltraktes und gelangen über die Blutzirkulation oder fokale Entzündungsherde in das ZNS. Durch unterschiedliche Strategien überwinden sie die Blut - Hirn - Schranke. Das Immunsystem des Wirtes versucht sich durch eine Entzündungsreaktion gegen die Eindringlinge zu wehren: In den Subarachnoidalraum strömen Leukozyten ein, es kann zu Vaskulitis, einem Hirnödem und sekundärer Ischämie kommen, und bakterielle Bestandteile aktivieren die residente Mikroglia. Die systemische Entzündungsreaktion sowie die Mikrogliaaktivierung führen neben der möglichen direkten Toxizität bakterieller Bestandteile zum neuronalen Schaden (Nau und Eiffert 2002). Die als Jarisch - Herxheimer - Reaktion bekannte Komplikation der antibiotischen Therapie tritt typischerweise etwa zwei Stunden nach Behandlungsbeginn einer durch Gram - negative Bakterien ausgelösten Erkrankung auf (Hurley 1995). Dieses Phänomen wird durch den massiven Zerfall der Krankheitserreger und die damit verbundene Freisetzung von Endotoxinen verursacht. Typische Symptome sind plötzlich auftretendes Fieber (auch mit Schüttelfrost) sowie eine Verschlimmerung der Symptome der ursprünglichen Infektionskrankheit. Im Prinzip können diese Symptome als ein Anzeichen der Wirksamkeit einer effektiven Therapie angesehen werden.

Alle bisher erwähnten Bakterien, die als Erreger der Meningitis in Frage kommen, besitzen Virulenzfaktoren, welche als TLR - Liganden gelten. So ist der TLR4 - Agonist LPS Bestandteil der Gram - negativen Bakterien *Haemophilus influenzae*, *E. coli* und *N. meningitidis*. Gram - positive Bakterien wie Streptokokken dagegen weisen einen hohen Anteil an Teichonsäure und Lipoteichonsäure in ihrer Zellwand auf, der bis zu 50 % ihres Trockengewichtes betragen kann (Nau & Eiffert 2002). Teichon- und Lipoteichonsäure sind Liganden von TLR2, Streptokokken der Gruppe B besitzen zusätzlich den TLR2 / TLR6-Agonisten GBS-F (*Heat-labile soluble Factor*). *Neisseria meningitidis* enthält den Löslichkeitsfaktor (*Soluble factor*, TLR2 / TLR1) sowie Porin (TLR2) als die TLR - Kaskade aktivierende Antigene. Alle genannten Bakterien enthalten des Weiteren unmethylisiertes CpG, welches TLR9 aktiviert (Akira & Sato 2003).

Wie aus dem oben Dargestellten ersichtlich wird, sind am klinischen Verlauf einer bakteriellen Meningitis immer mehrere TLR - Liganden beteiligt. Antibiotikatherapie oder Immunantwort führen zum Untergang von Bakterien und damit zur Freisetzung ihrer Zellwandbestandteile, wie z.B. dem LPS Gram - negativer oder der Lipoteichonsäure Gram - positiver Bakterien. Diese führen neben anderen, sezernierten bakteriellen Produkten zur Aktivierung der oben beschriebenen MyD88 - Kaskade über TLR. Es kommt unter anderem zum Anstieg von TNF- $\alpha$  und zur Induktion der NO - Synthetase i-NOS. TNF- $\alpha$  bewirkt seinerseits die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren einschließlich NF- $\kappa$ B oder kann auf anderen Wegen Apoptose induzieren und ist teilweise für den hippokampalen Schaden verantwortlich. i-NOS dagegen hat den Anstieg von NO und freien Radikalen zur Folge und begünstigt damit die Nekrose (Nau & Brück 2002). Die mRNA verschiedener TLR stieg im Hirngewebe von Versuchstieren nach Infektion mit bakteriellen und viralen Pathogenen an (Böttcher et al. 2003).

#### **1.4.2 Chronischer Entzündungsprozess im ZNS: Morbus Alzheimer**

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung, die in ihrer am häufigsten vorkommenden Form bei Personen über dem 65. Lebensjahr auftritt und für ungefähr 60 % der weltweit etwa 24 Millionen Demenzerkrankungen verantwortlich ist (Ferri et al. 2005).

In Gehirnen von Alzheimerpatienten wurde eine chronische Neuroinflammation beobachtet, die zu der Entzündungshypothese des Morbus Alzheimer führte (Wyss-Coray & Mucke, 2002). Ein Zusammenhang zwischen Morbus Alzheimer und der TLR - Kaskade konnte dargestellt werden (Fassbender et al. 2004). Die chronische Neuroinflammation führt vermutlich zu einem Fortschreiten der Neurodegeneration, durch welche diese Krankheit charakterisiert ist.



Fassbender et al. wiesen 2004 nach, dass fibrilläres menschliches Amyloid-beta 42 (A $\beta$ 1-42) an das lösliche, als LPS - Rezeptor bezeichnete Protein CD14 bindet. Dabei erwies sich die Fibrillenstruktur des A $\beta$ 1-42 als bedeutsam für das Bindungsverhalten: Fibrilläres A $\beta$ 1-42 zeigte eine 20fach höhere Interaktion mit CD14 als nichtfibrilläres A $\beta$ 1-42. Die Inhibition von CD14 hatte eine Verringerung der A $\beta$  / IFN- $\gamma$  - induzierten Freisetzung von NO und inflammatorischen Zytokinen zur Folge. Es ist bekannt, dass die Aktivierung von Mikrogliazellen, durch A $\beta$  durch die Sekretion einer großen Zahl von inflammatorisch wirksamen Substanzen zum Untergang von Neuronen führt (Colin et al. 2001). Es wurden von CD14 - defizienten Mikrogliazellen signifikant weniger Entzündungsaktivitätsmarker produziert als von Wildtypmikrogliazellen nach A $\beta$  - Exposition. Neutralisation von CD14 durch Antikörper führte zu einer Reduktion der A $\beta$  - induzierten Aktivierung und neurotoxischen Wirkung der Mikrogliazellen. Die Affinität von A $\beta$  zu CD14 ist allerdings etwa 50 mal niedriger als die von LPS zu CD14, der im Vergleich zu der eher geringen Konzentration von LPS während einer Infektion sehr hohe Gehalt an A $\beta$  - Fibrillen im von der Alzheimer-Krankheit befallenen Gehirn gleicht diesen Unterschied aber wieder aus. Vermutlich interagiert der CD14 / A $\beta$ -Komplex mit TLR4 und löst die intrazelluläre Signalkaskade aus, deren Konsequenzen möglicherweise entscheidend für die Unterhaltung der chronischen Neuroinflammation während der Alzheimer - Erkrankung sind (Fassbender et al. 2004). Eine spontane Funktionsverlustmutation im Gen für TLR4 sorgt für eine starke Inhibition der Mikroglia- und Monozytenaktivierung durch aggregierte Alzheimer - Amyloidpeptide, was eine signifikant geringere Freisetzung von IL-6, TNF- $\alpha$  und NO zur Folge hat (Walter et al. 2007). Mirjam Lotz et al. beobachteten 2005 einen additiven Effekt bei der Freisetzung von NO und TNF- $\alpha$  durch Mikrogliazellen nach der simultanen Gabe von niedrigdosiertem Pam<sub>3</sub>Cys und A $\beta$  sowie von LPS und A $\beta$ . Die gleichzeitige Anwendung von A $\beta$  und CpG zeigte diesen Effekt nicht.

## **1.5 Ziele**

Es sollen primäre murine Mikrogliazellkulturen aus den Hirnen neugeborener Mäuse gewonnen werden. Es werden neben Wildtypmäusen aus dem Stamm C57BL/6 auch Tiere verwendet, die keinen funktionierenden TLR4 aufweisen. Durch den Einsatz TLR4 - defizienter Mikrogliazellen soll erneut die Spezifität von LPS und Pneumolysin für TLR4 nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit sollen Auswirkungen der Substanzen LPS, Pneumolysin, Pam<sub>3</sub>Cys, HKAL und CpG in unterschiedlichen Dosierungen auf murine Mikrogliazellen *in vitro* gezeigt werden. Die verwendeten Stoffe kommen entweder in der Natur vor oder sind aktive Bestandteile natürlicher Antigene und typische Entzündungsaktivatoren im Rahmen der bakteriellen Meningitis. Sie sind Liganden der TLR.

Dabei geht es um die Suche nach Antworten auf folgende Fragen:

-Wie wirken sich die verwendeten Substanzen auf die Morphologie der Zellen aus? Ist anhand der morphologischen Veränderungen die Vitalität oder der Aktivierungszustand der Mikrogliazellen zu beurteilen? Durch Isolectin-B4 - Färbungen sollen die erwarteten Veränderungen der unterschiedlich behandelten Mikrogliazellen sichtbar gemacht werden.

-Wie beeinflussen die unterschiedlichen Dosen der Substanzen die Zellvitalität? Die Vitalität der Mikrogliazellen soll anhand des WST-1 - Testes beurteilt werden.

-In welchen Konzentrationen wirkt Pneumolysin stimulatorisch auf Mikrogliazellen? Ab welcher Konzentration von Pneumolysin tritt ein Zellschaden ein? Welche Konzentration an Pneumolysin bewirkt den Tod der Mikrogliazelle?

-Wieviel NO oder TNF- $\alpha$  wird jeweils durch stimulierte Mikrogliazellen freigesetzt? Mikrogliazellen sollen unterschiedlichen Dosierungen von LPS, Pneumolysin, Pam<sub>3</sub>Cys, HKAL und CpG ausgesetzt werden. Stickstoffmonoxid und TNF- $\alpha$  sollen gemessen und in Dosis - Wirkungs - Kurven dargestellt werden.

-Welche Dosis der Substanzen führt jeweils zu einer halbmaximalen NO - Freisetzung (EC<sub>50</sub>)? Anhand der EC<sub>50</sub> soll die stimulatorische Potenz der TLR - Liganden beurteilt werden.

-Ist die maximale NO - Freisetzung durch Mikrogliazellen nach Behandlung mit den verschiedenen TLR - Agonisten unterschiedlich hoch?

Erstmals sollen mehrere TLR - Liganden in bekannten Konzentrationen simultan zur Zellbehandlung benutzt werden. Die synchrone Verwendung verschiedener TLR - Liganden erscheint sinnvoll, weil während einer bakteriellen Meningitis immer mehrere TLR aktiviert werden. Folgende Fragen stellen sich:

-Gibt es einen additiven oder supraadditiven Effekt durch die gleichzeitige Verwendung zweier Substanzen, welche, allein verwendet, eine submaximale NO - Freisetzung durch Mikrogliazellen bewirkt hatten?

-Wird die NO - Produktion durch die simultane Behandlung mit zwei unterschiedlichen TLR - Agonisten, die alleine jeweils die maximale NO - Freisetzung zur Folge hat, noch gesteigert?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Verwendete Tiere**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für das Anlegen von primären Mikrogliazellkulturen Mäuse aus dem Stamm C57BL/6-N verwendet, die in der Universität Göttingen gezüchtet wurden. Des Weiteren kamen TLR4 - defiziente Mäuse des Stammes C3H/HeJ zur Anwendung. Der Mausstamm, C3H/HeJ reagiert hyporesponsiv auf LPS. Diese Mäuse besitzen eine *Missense* - Punktmutation innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von TLR4 (Poltorak et al. 1998). TLR4 - defiziente Mäuse wurden generiert, und auch die Makrophagen und B Zellen aus diesen Mäusen reagierten hyporesponsiv nach Stimulation mit LPS (Hoshino et al. 1999). Als Kontrolle wurden Mäuse des Stammes C3H/HeN verwendet. Die Verwendung der Tiere für die Herstellung der Zellkulturen wurden beim Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit angezeigt.

### **2.2 Primäre murine Mikroglia kulturen**

#### **2.2.1 Primärkultur**

##### Verwendete Tiere:

-Neugeborene Mäuse (0.-2. Tag postnatal) vom Stamm C57Bl6-N, vom Stamm C3H/HeJ (TLR4 - defizient) und vom Stamm C3H/HeN.

##### Erforderliche Geräte und Reagenzien:

-Autoklaviertes Präparationsbesteck

-Sterile Petrischalen, Falcon - Gefäße

-Binokulares Mikroskop (Carl Zeiss, Deutschland)

-Zentrifuge (Jouan CR 422, Frederick, USA)

-Costar - Zellkulturflaschen, 75 cm<sup>2</sup> (Corning Incorporated, New York)

-70%iges Ethanol

-Phosphat - gepufferte Salzlösung (PBS), steril

-Nährmedium für Mikroglia:

Dulbecco's Minimales essentielles Medium (DMEM) mit Glutamax-I ohne Natrium Pyruvat mit 4500 g/l Glucose mit Pyridoxin;

10 % Fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert;

5 % Penicillin-Streptomycin (PS), GIBCO

-Inkubator (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland), 5 % CO<sub>2</sub>.

Nach der Vorbereitung des semisterilen Arbeitsplatzes wurde der Kopf der Maus mit einer scharfen Schere abgetrennt und auf eine sterile Petrischale überführt. Der abgetrennte Kopf wurde mit 70%igem Ethanol benetzt und mittels einer gebogenen spitzen Pinzette auf der Petrischale fixiert. Mit einem Skalpell wurde die Kopfhaut vorsichtig aufgeritzt und mit einer Pinzette nach vorne gezogen. Die nun sichtbare zarte Schädelkalotte wurde entfernt. Das Gehirn wurde mit einem Spatel aus dem Schädel gelöst und in eine bereitstehende, mit PBS gefüllte Petrischale gelegt.

Das Gehirn wurde in eine weitere, mit PBS benetzte Petrischale überführt, das Kleinhirn wurde entfernt. Die Hemisphären wurden durch einen Skalpellschnitt getrennt. Nun konnten die Meningen mit Hilfe zweier Pinzetten entfernt werden. Die von den Hirnhäuten befreiten Hemisphären wurden bis zur weiteren Verarbeitung in einem Falcon - Gefäß mit 5 ml PBS bei Zimmertemperatur aufbewahrt. In einem Durchgang wurden auf diese Art 4 bis 13 Mäuse präpariert. Ein Falcon - Gefäß nahm drei bis vier von Meningen befreite Gehirne auf, die durch Trituieren homogenisiert wurden. Das Homogenat wurde zehn Minuten bei 1000 G und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit Nährmedium bedeckt, wobei für jeweils zwei verwendete Gehirne 2 ml Medium gebraucht wurden. Die Gewebsbestandteile wurden durch Trituieren im Medium gelöst. Jeweils 2 ml des Zell - Medium - Gemisches wurden in die mit je 10 ml Nährmedium gefüllten 75 - cm<sup>2</sup> - Costar - Kulturflaschen überführt. Unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit) erfolgte die Kultivierung der Zellen im Inkubator. Im Viertagesrhythmus wurde das Nährmedium unter sterilen Arbeitsbedingungen gegen 12 ml frisches ausgetauscht. Lichtmikroskopisch wurden die Kulturen regelmäßig inspiziert, um eventuelle Verunreinigungen rechtzeitig zu bemerken, aber auch, um das Wachstum zu beurteilen. In dem Nährmedium gingen innerhalb der nächsten Tage verschiedene Gehirnbestandteile, wie Neurone, zugrunde, es überlebten nur Astrozyten und Mikrogliazellen. Innerhalb von 10 bis 14 Tagen bildete sich ein dichter, am Boden der Kulturflaschen fixierter Astrozytenrasen mit lose darauf liegenden Mikrogliazellen. Die erste Ernte der Mikrogliazellen war nach erfolgreichem Wachstum der Kultur 12 bis 16 Tage nach der Präparation möglich.

### **2.2.2 Sekundärkultur**

Erforderliche Geräte und Reagenzien:

-Nährmedium für Mikrogliazellen (s.o.)

-Tryptanblaulösung 0,4 %, SIGMA, Deutschland

- Rotationschüttler (*Rotomix, Firma Bioblock Scientific, Schweiz*)
- Zentrifuge (*Jouan CR 422*)
- Sauger (*SUE 3, Firma Heto*)
- Neubauer - Zählkammer
- Mikroskop (*Olympus, Japan*)
- Falcon - Röhrchen a 50 ml
- Inkubator (*Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland*), 5 % CO<sub>2</sub>.

Die Ernte der Mikrogliazellen erfolgte einmal in der Woche, die Kulturen konnten insgesamt jeweils 4 bis 8 Mal geerntet werden. Nur Kulturen mit einem dichten Astrozytenrasen ohne sichtbare Verunreinigungen und nur mikroskopisch gesund erscheinende Mikroglia wurden für die Experimente verwendet.

Die Kulturflaschen wurden etwa 20 Minuten im Rotationsschüttler bei Zimmertemperatur geschüttelt, damit sich die am Astrozytenrasen nur leicht anhaftenden Mikrogliazellen lösen konnten. Im Anschluss daran wurden sie unter die Sterilbank gebracht. Das Nährmedium mit den abgelösten Mikrogliazellen wurde mittels Pipetten in Falcon - Röhrchen überführt. In diesen bildeten sich nach dem Zentrifugieren bei 250facher Erdbeschleunigung über zehn Minuten am Boden kleine Pellets. Der Überstand wurde fast vollständig mit dem Sauger entfernt. Mit einer Pipette wurde das Pellet in neuem Zellkulturmedium resuspendiert, der Inhalt der einzelnen Falcon - Röhrchen gesammelt und die Konzentration der Zellen bestimmt. Dazu wurden 10 µl des Zell - Medium - Gemisches in 90 µl 0,4%iges Trypanblau pipettiert, hiervon 10 µl entnommen und auf die Zählkammer aufgetragen. Unter dem Mikroskop wurde in acht Feldern die Zellzahl bestimmt, das arithmetische Mittel gebildet und das Ergebnis mit 10<sup>5</sup> multipliziert (10µl x 10<sup>5</sup> = 1 Liter). Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension mit Nährmedium bis zur gewünschten Konzentration verdünnt.

In der Konzentration von 75 000 Zellen je Napf erfolgte die Aussaat in die Näpfe (*wells*) von 96 - Well - Platten, in einer Konzentration von 150 000 Zellen pro Napf in 24 - Well - Platten. Das verwendete Volumen betrug in den 96 - Well - Platten 150 µl je Napf, in den 24 - Well - Platten 300 µl pro Napf. Die Sekundärkultur wurde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mindestens zwei Stunden inkubiert, bevor die Experimente durchgeführt wurden.

## **2.3 Stimulation der Mikroglia mit TLR - Agonisten**

### Erforderliche Geräte und Reagenzien:

-Multipipette

-Inkubator (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland), 5 % CO<sub>2</sub>

-Verschiedene TLR - Liganden: Pam<sub>3</sub>Cys, HKAL, LPS, Pneumolysin, CpG (Beschreibung im folgenden Text).

-Interferon- $\gamma$  (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

-Nährmedium für Mikrogliazellen (s.o.).

In den gewünschten Konzentrationen wurden die unterschiedlichen Stimulanzen zur Sekundärkultur zugefügt. Dazu wurde aus dem entsprechenden Napf die Hälfte des Überstandes (z.B. 75  $\mu$ l in der 96 - Well - Platte) entfernt. Die am Boden haftenden Zellen verblieben im Napf. Das entfernte Volumen wurde durch die gleiche Menge der verschiedenen in mit Interferon- $\gamma$  versetzten Nährmedium gelösten Substanzen ersetzt. Berücksichtigt wurde hierbei, dass die Konzentration der jeweiligen Substanz im Austauschvolumen doppelt so hoch war wie die im Napf angestrebte Endkonzentration, weil ja nur die Hälfte des Volumens ersetzt wurde. Das Interferon- $\gamma$ , welches für die Aktivierung der Mikrogliazellen unverzichtbar ist, wurde dem Nährmedium im Verhältnis 1:500 zugesetzt, das Endverhältnis Interferon- $\gamma$  zu Medium im Well betrug somit 1:1000. Die Zielkonzentration Interferon  $\gamma$  lag bei 100 U/ml. Die nun den verschiedenen Substanzen ausgesetzten Zellen wurden in den Inkubator gebracht. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit).

Der Kontrolle wurde das entnommene Volumen durch Medium ersetzt, welchem Interferon- $\gamma$  zugesetzt war. Die verwendeten TLR - Liganden werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

### **2.3.1 TLR2 - Agonisten: Pam<sub>3</sub>Cys und HKAL**

Die Stimulanzen Pam<sub>3</sub>Cys und HKAL wirken spezifisch an TLR2.

Es wurde in den Versuchen Pam<sub>3</sub>Cys der Firma EMC-Microcollections GmbH aus Tübingen in Deutschland eingesetzt. Die Stammkonzentration dieser Substanz betrug nach Herstellerangaben 100 mg/ml.

Folgende Konzentrationen von Pam<sub>3</sub>Cys wurden in den Experimenten verwendet: 1; 3; 10; 30; 100; 300 und 1000  $\mu$ g/ml, das entspricht jeweils 1; 3; 10; 30; 100; 300 und 1000  $\mu$ M. Ab 300

µg/ml beobachteten wir regelmäßig Ausflockungen. Dieses Löslichkeitsproblem des verwendeten Pam<sub>3</sub>Cys wirkte sich negativ auf die Experimente aus.

HKAL ist ein durch Hitze getötetes Bakterium. Es ist eine übliche Methode, Bakterien durch Einwirkung von Hitze abzutöten, dabei gehen bestimmte Antigenstrukturen der Bakterienzellwand nicht verloren, sind aber nicht in ihrer exakten Konzentration bekannt. Die Konzentration wird daher in Anzahl der Bakterien pro Milliliter angegeben. Das hitzeinaktivierte Bakterium *Acholeplasma laidlawi* stammte von der Firma InvivoGen, San Diego, USA. Die Zellwandbestandteile des Bakteriums aktivieren den TLR2.

In den Experimenten wurden folgende Konzentrationen an HKAL verwendet: 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup> Zellen pro ml.

### **2.3.2 TLR4 - Agonisten: Pneumolysin und LPS**

Sowohl Pneumolysin als auch LPS sind spezifische Liganden an TLR4.

Das benutzte Pneumolysin, freundlicherweise von Professor Timothy Mitchell des Glasgow Biomedical Research Centre, University of Glasgow zur Verfügung gestellt, hatte eine Stammkonzentration von 500 µg/ml. Es wurde nach Überexpression in *E. coli* JM 109 durch hydrophobe und *Ion-Exchange* (deutsch: Ionenaustausch - Chromographie) gereinigt.

Die Reinheit des Toxins war durch SDS - Polyacrylamid - Gel - Elektrophorese und anschließende Coomassie - Blue - Färbung, welche eine einfache 52 - kDa - Bande mit 95 % des Proteins zeigte, nachgewiesen worden.

In den Experimenten wurden folgende Konzentrationen an Pneumolysin eingesetzt: 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 und 10 µg/ml, das entspricht jeweils 0,2; 0,6; 2; 6; 20; 60 und 200 nM.

Das zur Stimulation verwendete LPS entstammte dem *Escherichia-coli* - Stereotypen 026 : B6. Es wurde in der Firma Sigma aus Taufkirchen auf eine Stammkonzentration von 1 mg/ml verdünnt.

In folgenden Konzentrationen wurde LPS in den Experimenten eingesetzt: 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1 und 10 µg/ml, das entspricht 0,01; 0,1; 1; 10; 100 und 1000 nM.

### **2.3.3 TLR9 - Agonist: CpG**

CpG ist spezifischer Ligand von TLR9. In den Experimenten dieser Arbeit wurden synthetisch hergestellte Oligodesoxynukleotide (ODN 1668) (TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT) verwendet, welche in der Firma TIB Molbiol aus Berlin, Deutschland. mit einer

Stammkonzentration von 3192 µg/ml hergestellt wurden. Die verwendeten CpG - Sequenzen simulieren die in bakterieller, aber nicht in Säugetier - DNA vorkommenden Nukleotidsequenzen. Bakterielle CpG - Oligodesoxynukleotide weisen im Vergleich zu Säugetier - CpG mehr unmethylierte DNA - Sequenzen auf. Die in der DNA - Struktur von Bakterien vorkommenden ähnlichen Kombinationen wirken als potente Antigene ebenfalls am TLR9 (Sparwasser et al. 1997; Wagner 1999; Hemmi et al. 2000).

In den Experimenten wurde CpG in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0,01; 0,03; 0,1; 1; 10; 100 und 1000 µg/ml, das entspricht jeweils 1,5; 4,5; 15; 150 und 1500 nM, 15; 150 µM.

## **2.4 Quantifizierung der Stimulation und Vitalitätstests**

Die stimulierten Zellen verblieben über 24 Stunden unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit) im Inkubator. Stimulierte Mikrogliazellen produzieren NO und TNF-α und sezernieren sie in ihre Umgebung.

### **2.4.1 Nitritmessung**

#### Erforderliche Geräte und Reagenzien

-Sterile Wannen und Falcon - Röhrchen

-96 - Loch - Platten

-Multipipette

-Genios multiplate reader (TECAN, Crailsheim, Deutschland)

-1 % Sulfonilamid in 30 % Acetat

-0,1 % N-(1-Naphthyl)ethyldiamin in 60 % Acetat.

Die NO - Bestimmung erfolgte indirekt durch die Messung von Nitrit, einem seiner stabilen Reaktionsprodukte. Mit der Multipipette wurden aus jedem Loch 100 µl Überstand entnommen und auf eine zweite 96 - Loch - Platte übertragen. 100 µl der aus gleichen Mengen 1 % Sulfonilamid in 30 % Acetat und 0,1 % N-(1-Naphthyl)ethyleIndiamin in 60 % Acetat hergestellten Griebreagenz wurden dem Überstand beigelegt. Es war ein prompter, vom Nitrit - Gehalt des Überstandes abhängiger Farbumschlag zu beobachten, der im Genios - Reader photometrisch bei 570 nm gemessen wurde.

Die Konzentration des Nitrits im Überstand wurde anhand einer Standardkurve aus der gemessenen Absorption berechnet. Diese Standardkurve wurde bei jeder Messung mittels Lösungen von Nitrit in bekannter Konzentrationen (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625;



0mg/ml) in jeweils 100 µl Natriumnitrat, welches auf die oben beschriebene Art anstelle des Überstandes mit Grieffreagenz behandelt wurde, ermittelt.

Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen sofort für den unten beschriebenen WST-1 - Test weiterverwendet

Das auf der ersten 96 - Loch - Platte verbliebene Volumen von ca. 50 µl wurde auf eine dritte 96 - Loch - Platte pipettiert und für den geplanten TNF- $\alpha$  - ELISA bei -80 °C aufbewahrt.

## **2.4.2 TNF- $\alpha$ - Messung**

### Erforderliche Geräte und Reagenzien

-*Genios multiplate reader (TECAN, Crailsheim, Deutschland)*

-*Immunoassay Quantikine® M (R & D Systems, Wiesbaden, Deutschland).*

Zur Bestimmung von Maus - TNF- $\alpha$  wurde der Immunoassay Quantikine® M von R&D Systems verwendet. "ELISA" steht für "*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*", ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren.

Die benutzten ELISA - Kits enthielten eine Platte mit 96 Vertiefungen, die als Probengefäße dienten. Das Prinzip des *Sandwich* - Immunoassays beruht darauf, dass sich an eine auf dem Probegefäß befindliche, in diesem Fall für TNF- $\alpha$  spezifische Antikörperschicht das Protein bindet. Im nächsten Schritt wurden nun jeweils mit einem Markerprotein versetzte TNF- $\alpha$  - spezifische Antikörper hinzugefügt, welche sich ebenfalls mit dem Protein verbanden. Das Markerenzym war ein Peroxidasemarkiertes Konjugat, als Substrat für die Peroxidase wurde Tetramethylbenzidin eingesetzt.

Der Farbumschlag war abhängig von der TNF- $\alpha$  - Konzentration in der Probe und wird bei 450 nm photometrisch bestimmt. Anhand der Standardkurve konnte die Konzentration des Proteins bestimmt werden. Hierbei wurden die Proben, eine Kontrolle und Standards mit folgenden Konzentrationen in die Mikro - Platten pipettiert: 1500 pg/ml; 750 pg/ml; 375 pg/ml; 187,5 pg/ml; 93,8 pg/ml; 46,9 pg/ml; 23,4 pg/ml; 0 pg/ml. Da in den Überstand relativ große Mengen TNF- $\alpha$  sezerniert worden waren, musste er entsprechend verdünnt werden. Nach einer Inkubation von zwei Stunden bei Raumtemperatur wurden die Platten fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen. Die Lösung des enzymgekoppelten Antikörpers wurde im Anschluss daran ebenfalls für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschvorgang erfolgte eine 30 Minuten lange Inkubation mit der Substratlösung, bevor die Enzymreaktion mit Hilfe einer Stopplösung unterbrochen wurde. Nun wurde die optische Dichte mit dem *Genios multiplate reader* bei 450 nm gemessen. Die Wellenlängenkorrektur wurde zum Ausgleich

eventueller optischer Unebenheiten in den Platten auf 540 nm eingestellt. Anhand der Standardkurve konnten nun die einzelnen Mengen an TNF- $\alpha$  bestimmt werden.

### **2.4.3 Isolectin-B4 - Färbung**

#### Erforderliche Geräte und Reagenzien:

-Triton X (0,1 % in PBS)

-Biotiniliertes Isolectin B4 (5  $\mu\text{g/ml}$  in PBS + 1 % BSA, Taufkirchen, Deutschland)

-Avidin - Biotin - Komplex: ABC (Vector, Burlingame, Kanada)

-Diaminobenzidin (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland)

-Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland).

Um die Reinheit der Mikrogliazellkultur nachzuweisen und um morphologische Veränderungen der Zellen nach der Stimulation zu bewerten, wurde die Isolektin-B4 - Färbung durchgeführt. Diese Methode wurde von Streit 1990 erstmals als Möglichkeit einer Färbung von Säugetier-Mikrogliazellen beschrieben. Er benutzte für diese für Mikrogliazellen spezifische Färbemethode das Lectin von der Afrikanischen Schwarzbohne *Griffonia simplicifolia*. Für die Färbung wurden die Mikrogliazellen auf Deckgläsern ausgeplattet und mit den unterschiedlichen TLR - Agonisten behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd über 30 Minuten fixiert. Die fixierten Zellen wurden über 30 Minuten mit Triton X behandelt, dann für 90 Minuten biotinyliertem Isolectin B4 ausgesetzt. Danach wurden die Zellen 30 Minuten mit dem Avidin - Biotin - Komplex behandelt. Nach Einwirkung von Diaminobenzidin über fünf Minuten wurden die Zelleiber und Fortsätze der Mikrogliazellen bräunlich angefärbt. Die Kerne wurden durch Gegenfärbung mit Hämalaun sichtbar gemacht, sie stellten sich als blaue Strukturen dar. Der Anteil der Mikrogliazellen betrug in den verwendeten Kulturen stets mehr als 98 %.

### **2.4.4 WST-1 - Test**

#### Erforderliche Geräte und Reagenzien:

-Genios multiplate reader (TECAN, Crailsheim, Deutschland)

-Inkubator (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland), 5 % CO<sub>2</sub>

-Nährmedium für Mikrogliazellen (s.o.)

-WST-1 - Zellproliferationsreagenz (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland).

Wasserlösliches Tetrazolium (Water soluble Tetrazolium = WST) wird als eine Möglichkeit der Beurteilung der Zellvitalität eingesetzt (Scudiero et al. 1988, Meshulam et al. 1995). Dieser Test beruht darauf, dass das Tetrazoliumsalz WST-1 durch vitale Mitochondrien in ein lösliches Formazan umgewandelt wird. Der Farbumschlag wird photometrisch bestimmt. Eine solche Reaktion erfolgt ausschließlich in lebenden Zellen. Nachdem der Überstand wie im oben beschriebenen Arbeitsschritt entfernt worden war, wurden die Zellen mit 100 µl je Napf im Verhältnis 1:10 mit Nährmedium verdünnter WST - Reagenz aufgefüllt. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen möglichst kurze Zeit unbenetzt blieben, um ein eventuelles Austrocknen zu verhindern. Die Sekundärkultur wurde in den Inkubator verbracht, wo sie zwei Stunden verblieb.

Nach dieser Zeit wurde die optische Dichte bei 490 nm gemessen. Der Mittelwert der optischen Dichten in Nöpfen mit unbehandelten Zellen wurde mit einer Zellvitalität von 100% gleichgesetzt. Die optischen Dichten der einzelnen Nöpfe mit behandelten Zellen wurden auf diesen Wert bezogen.

## 2.5 Statistik

Zur Durchführung der statistischen Analysen sowie zur Erstellung der verschiedenen Grafiken wurde das Computerprogramm Graph Pad Prism (GraphPad Software, San Diego California, USA) verwendet. Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Die Daten wurden mit Hilfe des Student's-t-Tests oder ANOVA analysiert, anschließend wurde zur Korrektur der globalen Erhöhung der Alpha-Fehler-Wahrscheinlichkeit (Fehler 1. Art) durch multiples Testen in derselben Stichprobe Bonferronis multipler Vergleichstest angewandt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. In den Abbildungen und Tabellen stehen Sternchen symbolisch für p, es gilt: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Durch Anpassung sigmoidaler Kurven an die graphisch dargestellten Dosis - Wirkungs - Beziehungen konnte diejenige Konzentration ermittelt werden, durch welche die halbmaximale Wirkung hervorgerufen wurde ( $EC_{50}$ ) [ $Y=1 / (1+EC_{50} / X)$ ].

Der erwartete Effekt ( $E_{(A+B)erwartet}$ ) nach Costimulation mit zwei TLR - Liganden (A+B) wurde nach dem Modell des funktionellen Synergismus (Pösch 1981) berechnet, wie in folgender Gleichung dargestellt:

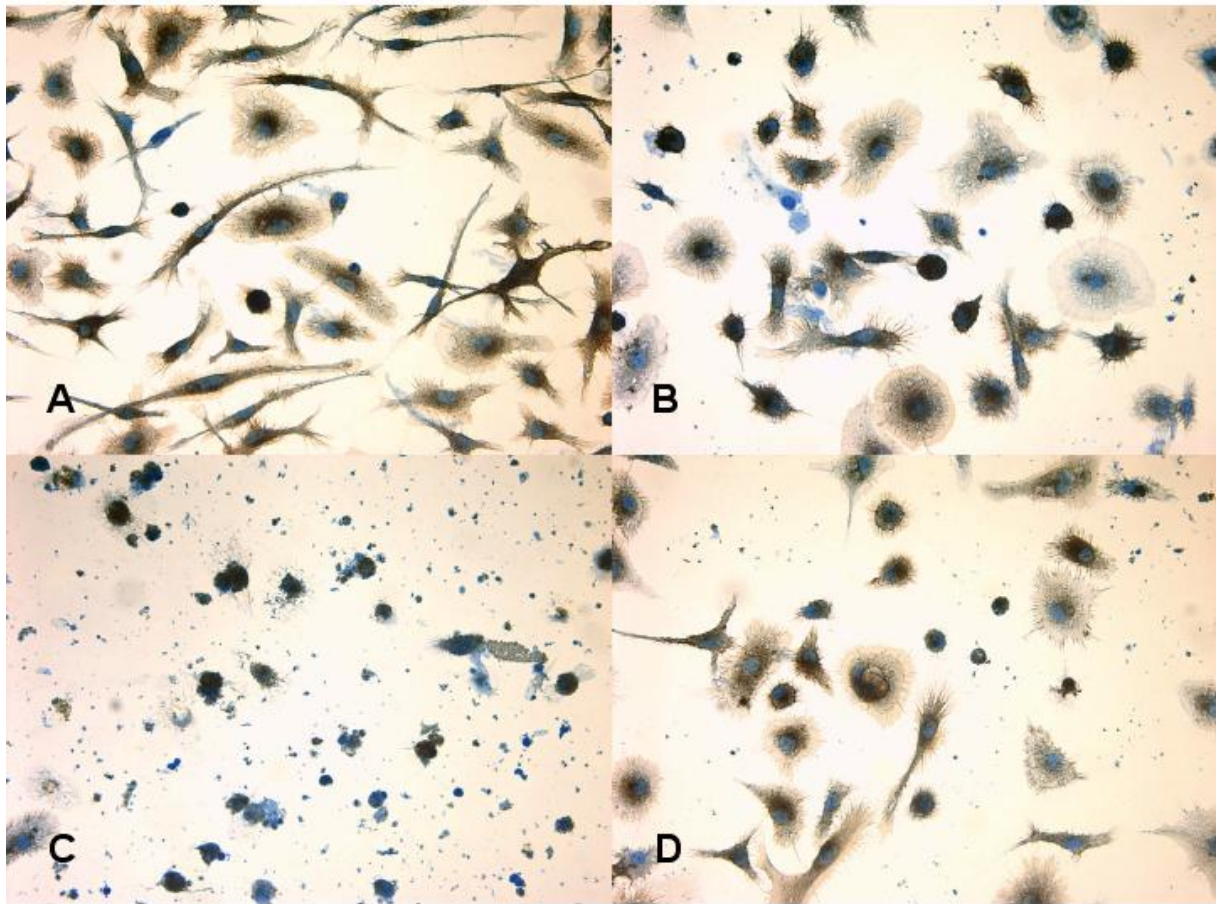
$$E_{(A+B)erwartet} = E_{(A)gemessen} + E_{(B)gemessen} - E_{(A)gemessen} \times E_{(B)gemessen}$$

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Morphologische Veränderungen

Kultivierte Mikrogliazellen in bekannten Konzentrationen wurden fünf verschiedenen TLR - Agonisten ausgesetzt: den beiden TLR2 - Agonisten Pam<sub>3</sub>Cys und HKAL, den beiden TLR4 - Agonisten Pneumolysin und LPS sowie dem TLR9 - Agonisten CpG. In Vorversuchen wurden die Mikrogliazellen den TLR - Liganden über kürzere Zeiträume (4, 8 und 12 Stunden) ausgesetzt. Anschließend wurden entweder keine oder sehr niedrige Konzentrationen von NO und TNF- $\alpha$  gemessen. Die Behandlung erfolgte deshalb über 24 Stunden. Um die Vitalität und die Reinheit der Zellkultur zu überprüfen, wurde die Isolectin-B4 - Färbung durchgeführt. Zum Vergleich mit unbehandelten Zellen wurde eine Kontrollgruppe angefärbt (Abbildung 1A). Gut zu sehen waren die für vitale Mikrogliazellen typischen langen Zellfortsätze, Die Färbung führt zu einer bräunlichen Verfärbung der Zelleiber, während sich die Kerne bläulich darstellen. Diese Anfärbung ist spezifisch für Makrophagen. Da keine anders gefärbten Zellen sichtbar sind, ist die Reinheit der Mikrogliakultur in der Abbildung 1 nachgewiesen.

Die Behandlung mit den oben genannten Substanzen führte zur Abrundung der Zellen und einem Verlust der Zellfortsätze, wie anhand der Beispiele in Abbildung 1B und 1D ersichtlich wird. Die hier verwendeten Konzentrationen von Pneumolysin und LPS führten in den Versuchen jeweils zu maximaler NO - und TNF- $\alpha$  - Freisetzung. Diese morphologischen Veränderungen sind charakteristisch für eine starke Stimulation der Mikrogliazellen durch die Liganden und konnten an mit Pam<sub>3</sub>Cys - bzw. HKAL - behandelten Zellen ebenfalls beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurden die Zellen aus der Abbildung 1C einer Konzentration an Pneumolysin ausgesetzt, die in den Versuchen auf die Zellen letal wirkte. Die Zellen sind nicht mehr intakt, da Pneumolysin die Zellen lysiert hat. Zellfragmente sind zu erkennen - ein bildhafter Beweis für deren Exitus.

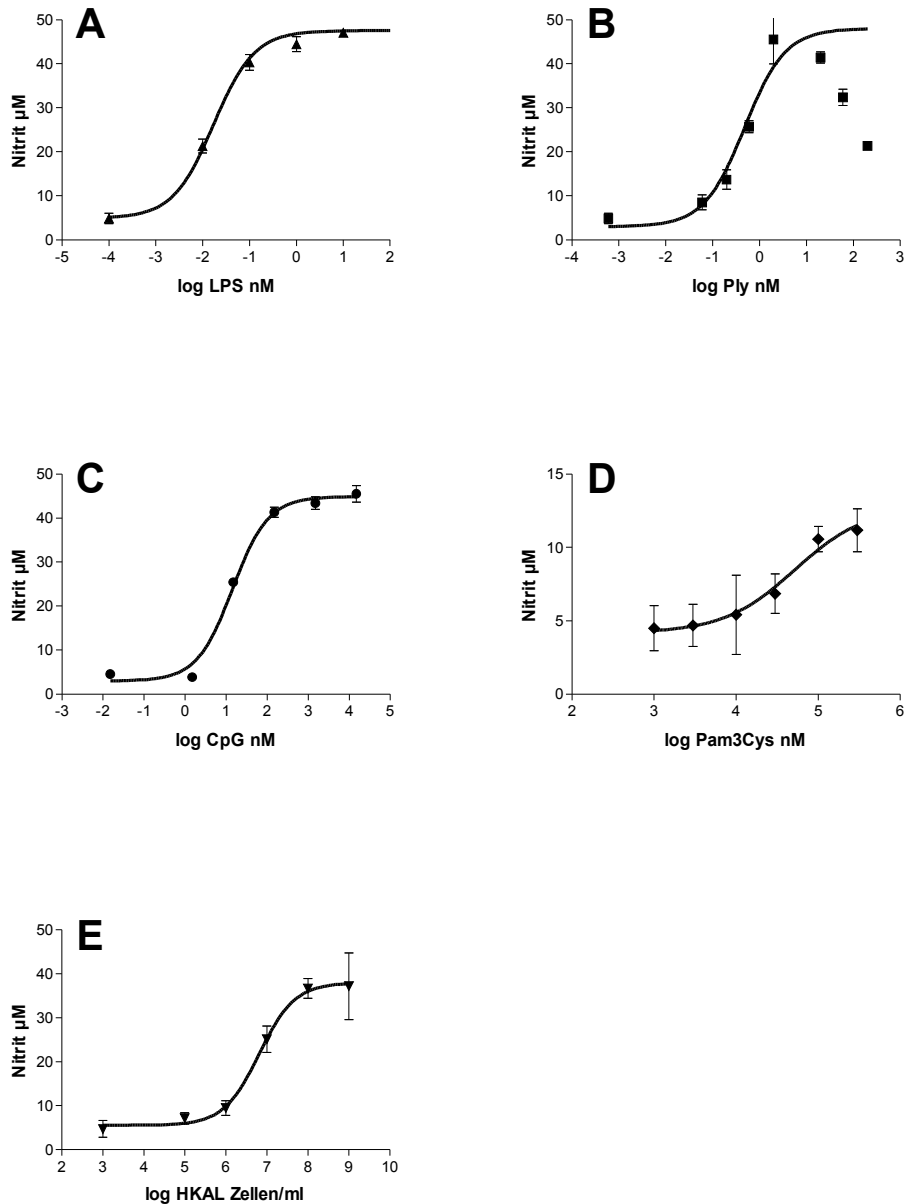


**Abbildung 1: Isolectin-B4 - Färbung und Hämalaun - Gegenfärbung von Mikrogliazellen** nach 24 - stündiger Behandlung mit: **A:** Medium + Interferon- $\gamma$  (Kontrolle); **B:** 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS; **C:** 10  $\mu\text{g/ml}$  Pneumolysin; **D:** 0,3  $\mu\text{g/ml}$  Pneumolysin. **A** zeigt ruhende Mikrogliazellen mit Fortsätzen. **B** und **D** zeigen die typischen morphologischen Veränderungen stimulierter Mikrogliazellen, wie den Verlust der Fortsätze und runde Form. In **C** ist der zytotoxische Effekt des hochkonzentrierten Pneumolysins erkennbar, die Zellen leben nicht mehr. (Nach: Ebert et al. 2005)

### 3.2 Dosis - Wirkungs - Kurven für die NO - Freisetzung

Die Stimulation der Mikrogliazellen führte zu einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren und NO. Es wurde der Gehalt an NO im Überstand der Mikrogliazellen bestimmt, welche über den Zeitraum von 24 Stunden unterschiedlichen Konzentrationen von LPS, Pneumolysin, CpG, HKAL und Pam<sub>3</sub>Cys ausgesetzt waren. Die Behandlung mit allen genannten TLR - Agonisten führte zu einer Erhöhung der NO - Konzentrationen im Überstand, ein Zeichen der erfolgreichen Stimulation der Mikrogliazellen. Für jeden der TLR - Agonisten wurden die Dosis - Wirkungs - Kurven für den Parameter NO in sechs voneinander unabhängigen Experimenten erstellt (s.o.).

Die NO - Freisetzung erfolgte bei allen verwendeten Substanzen dosisabhängig. Beispielhafte Dosis - Wirkungs - Kurven für die Behandlung von Mikrogliazellen mit LPS, Pneumolysin, CpG, Pam<sub>3</sub>Cys und HKAL wurden in Abbildung 2 zusammengefasst. In Abbildung 2B ist ein Abfall der NO - Freisetzung beim Einsatz hochkonzentrierten Pneumolysins erkennbar, was sich durch dessen zytotoxische Wirkung erklären lässt. In den anderen Kurven zeigen sich sigmoide Kurven, es wird jeweils ein Plateau erreicht. Die EC<sub>50</sub> wurde anhand der Dosis - Wirkungs - Kurven für NO bestimmt. Jeder Wert in Abbildung 2 repräsentiert den Mittelwert ± Standardabweichung von jeweils drei bis sechs Messungen. Die EC<sub>50</sub> für die NO - Freisetzung war für LPS  $0,036 \pm 0,012$  nM, für Pneumolysin  $0,59 \pm 0,13$  nM,  $16,28 \pm 7,69$  nM für CpG und  $60,96 \pm 19,32$  μM für Pam<sub>3</sub>Cys ( $p < 0,01$ ). Die Behandlung mit HKAL rief eine starke NO - Produktion hervor. HKAL besteht aus hitzeinaktivierten ganzen Bakterien, ein direkter Vergleich mit den anderen Substanzen ist nicht möglich, da die Stammkonzentration von HKAL nicht in μg/ml, sondern in Zellzahl pro ml angegeben wird. Die EC<sub>50</sub> von HKAL betrug in unseren Versuchen  $6,6 \times 10^6$  Zellen/ml für die NO - Freisetzung. Die EC<sub>50</sub> für die TLR - Liganden sind im Säulendiagramm in Abbildung 4 dargestellt. Für weitere Experimente wurden die Konzentrationen ermittelt, die eine maximalen NO - Freisetzung bewirkten: Die Behandlung mit 6 nM Pneumolysin, 1500 nM CpG und 100 nM LPS führten jeweils zur maximalen NO - Freisetzung.

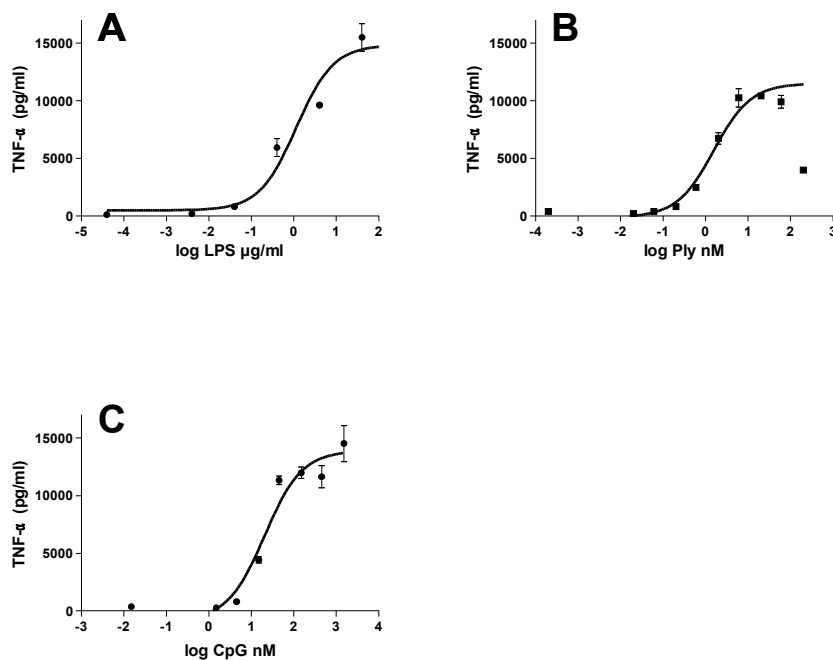


**Abbildung 2: Dosis - Wirkungs - Kurven für NO - Freisetzung.** Gezeigt werden beispielhafte Dosis - Wirkungs - Kurven nach 24 - stündiger Behandlung von Mikrogliazellen für die Freisetzung von NO. In **B** war ein Abfall der NO - Freisetzung beim Einsatz hochkonzentrierten Pneumolysins erkennbar, was sich durch dessen zytotoxische Wirkung erklären läßt. In den anderen Beispielen zeigten sich sigmoide Kurven, es wird jeweils ein Plateau erreicht. Die  $EC_{50}$  für die NO - Freisetzung war für LPS  $0,036 \pm 0,012$  nM, für Pneumolysin  $0,59 \pm 0,13$  nM,  $16,28 \pm 7,69$  nM für CpG und  $60,96 \pm 19,32$  µM für Pam<sub>3</sub>Cys ( $p < 0,01$ ). Die Behandlung mit HKAL rief eine starke NO - und TNF- $\alpha$  - Produktion hervor. HKAL besteht aus hitzeinaktivierten ganzen Bakterien, ein direkter Vergleich mit den anderen Substanzen ist nicht möglich, da die Stammkonzentration von HKAL nicht in µg/ml, sondern in Zellzahl pro ml angegeben wird. Die  $EC_{50}$  von HKAL betrug  $6,6 \times 10^6$  Zellen/ml für die NO - Freisetzung. (Nach: Ebert et al. 2005)

### 3.3 Dosis - Wirkungs - Kurven für die TNF- $\alpha$ - Freisetzung

Die Stimulation der Mikrogliazellen führte zu einer Sekretion von TNF- $\alpha$ . Der Gehalt an TNF- $\alpha$  im Überstand der Mikrogliazellen nach 24 - stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von LPS, Pneumolysin, CpG, HKAL und Pam<sub>3</sub>Cys wurde bestimmt. In Abbildung 3 sind repräsentative Dosis - Wirkungs - Kurven für die TNF- $\alpha$  - Freisetzung nach der Behandlung von Mikrogliazellen mit LPS, Pneumolysin und CpG, dargestellt. Jeder Wert in Abbildung 3 repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von jeweils drei bis sechs Messungen. In allen drei Beispielen ist ein dosisabhängiger Anstieg von TNF- $\alpha$  zu erkennen. Der Mittelwert der EC<sub>50</sub> für die TNF- $\alpha$  - Freisetzung betrug für LPS  $0,87 \pm 0,83$  nM, für Pneumolysin  $2,97 \pm 1,70$  nM und für CpG  $29,63 \pm 16,18$  nM ( $p < 0,05$ ).

Das verwendete Pam<sub>3</sub>Cys löste sich nicht optimal, vermutlich aus diesem Grund wurde durch Pam<sub>3</sub>Cys keine maximale Stimulation erreicht. Deshalb konnte die EC<sub>50</sub> für die TNF- $\alpha$  - Freisetzung für Pam<sub>3</sub>Cys nicht ermittelt werden.

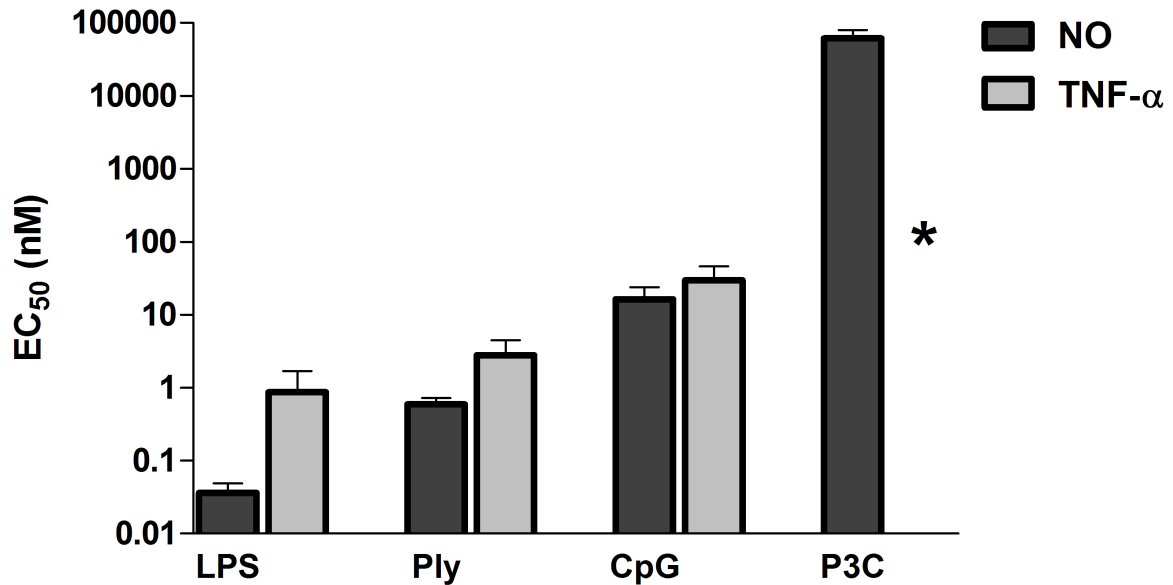


**Abbildung 3: Dosis - Wirkungs - Kurven für die TNF- $\alpha$  - Freisetzung.** Gezeigt werden beispielhafte Dosis - Wirkungs - Kurven nach 24 - stündiger Behandlung von Mikrogliazellen mit LPS, CpG und Pneumolysin für die Freisetzung von TNF- $\alpha$ . Der Mittelwert der EC<sub>50</sub> für die TNF- $\alpha$  - Freisetzung betrug für LPS  $0,87 \pm 0,83$  nM, für Pneumolysin  $2,97 \pm 1,70$  nM und für CpG  $29,63 \pm 16,18$  nM. ( $p < 0,05$ ). Das verwendete Pam<sub>3</sub>Cys löste sich nicht optimal, vermutlich aus diesem Grund wurde durch Pam<sub>3</sub>Cys keine maximale Stimulation erreicht. Darum konnte die EC<sub>50</sub> für die TNF- $\alpha$  - Freisetzung für Pam<sub>3</sub>Cys nicht ermittelt werden.



### 3.4 Relative stimulatorische Potenz

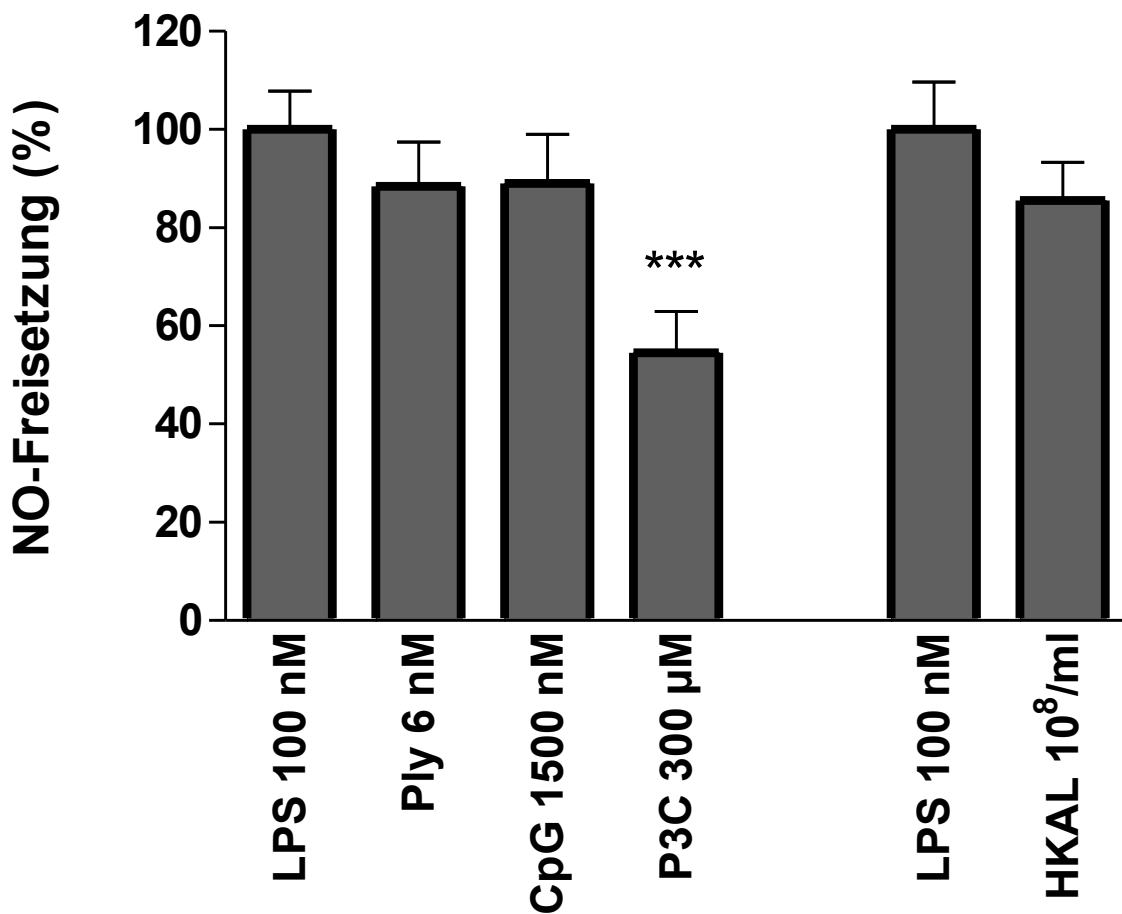
Anhand der Dosis - Wirkungs - Kurven wurde die  $EC_{50}$  für die NO - bzw. TNF- $\alpha$  - Freisetzung bestimmt. Die  $EC_{50}$  wurde als Maß für die stimulatorische Potenz des jeweiligen TLR - Agonisten angesehen. Je niedriger die  $EC_{50}$ , desto höher ist die Potenz. Die  $EC_{50}$  für die Freisetzung von TNF- $\alpha$  war jeweils höher als die entsprechende  $EC_{50}$  für die NO - Freisetzung. Verglichen wurden alle Gruppen untereinander. Der Mittelwert für  $EC_{50}$  für die NO - Freisetzung war jeweils  $0,036 \pm 0,012$  nM für LPS,  $0,59 \pm 0,13$  nM für Pneumolysin,  $16,28 \pm 7,69$  nM für CpG und  $60,958 \pm 19,319$   $\mu$ M für Pam<sub>3</sub>Cys. Die p-Werte waren beim Vergleich der NO-Freisetzung der Gruppen untereinander jeweils  $< 0,01$ . Für die TNF- $\alpha$  - Freisetzung war der Mittelwert jeweils  $0,87 \pm 0,83$  nM für LPS,  $2,79 \pm 1,70$  nM für Pneumolysin und  $29,63 \pm 16,18$  nM für CpG. Die p-Werte waren beim Vergleich der Gruppen untereinander für die TNF- $\alpha$  - Freisetzung jeweils  $< 0,05$  (außer für Pneumolysin versus LPS). Die  $EC_{50}$  für die TLR - Liganden sind im Säulendiagramm in Abbildung 4 dargestellt. Die stärkste Potenz unter den eingesetzten Stimulanzien zeigte sowohl für die NO - als auch für die TNF- $\alpha$  - Freisetzung demnach LPS, gefolgt von Pneumolysin und CpG. Pam<sub>3</sub>Cys löste sich nicht optimal im Medium, so dass keine maximale TNF- $\alpha$  - Freisetzung nach Pam<sub>3</sub>Cys -Behandlung erfolgte. Daher konnte die  $EC_{50}$  für die Freisetzung von TNF- $\alpha$  nach der Behandlung mit Pam<sub>3</sub>Cys nicht bestimmt werden. Die  $EC_{50}$  von Pam<sub>3</sub>Cys für die NO - Freisetzung wurde in dieser Arbeit aus diesem Grund fälschlicherweise zu hoch bestimmt. Die Behandlung mit HKAL rief jeweils eine starke NO - und TNF- $\alpha$  - Produktion hervor. HKAL besteht aus hitzeinaktivierten ganzen Bakterien, ein direkter Vergleich mit den anderen Substanzen ist nicht möglich, da die Stammkonzentration von HKAL nicht in  $\mu$ g/ml, sondern in Zellzahl pro ml angegeben wird. Die  $EC_{50}$  von HKAL betrug in unseren Versuchen  $6,6 \times 10^6$  Zellen pro ml für die NO - Freisetzung.



**Abbildung 4: Relative stimulatorische Potenz.** Gezeigt werden die ermittelten Konzentrationen der TLR - Liganden LPS, Pneumolysin (PLY), CpG und Pam<sub>3</sub>Cys (P3C), welche jeweils eine halbmaximale NO - oder TNF-α - Freisetzung bewirkten (EC<sub>50</sub>). Der Mittelwert der EC<sub>50</sub> für die NO - Freisetzung war jeweils 0,036 ± 0,012 nM für LPS, 0,59 ± 0,13 nM für Pneumolysin, 16,28 ± 7,69 nM für CpG und 60,958 ± 19,319 μM für Pam<sub>3</sub>Cys (p < 0,01). Für die TNF-α - Freisetzung war der Mittelwert jeweils 0,87 ± 0,83 nM für LPS, 2,79 ± 1,70 nM für Pneumolysin und 29,63 ± 16,18 nM für CpG (p < 0,05). Das verwendete Pam<sub>3</sub>Cys löste sich nicht optimal, vermutlich aus diesem Grund wurde durch die Pam<sub>3</sub>Cys - Behandlung keine maximale TNF-α - Freisetzung erreicht. Daher konnte die EC<sub>50</sub> für TNF-α nach Pam<sub>3</sub>Cys - Behandlung nicht bestimmt werden. (\*).(Nach: Ebert et al. 2005.)

### 3.5 NO - Freisetzung nach maximaler Stimulation

In Dosis - Wirkungs - Kurven waren vorher die Konzentrationen ermittelt worden, die zu einer maximalen NO - Freisetzung geführt hatten (Abbildung 2). Die Behandlung von 6 nM Pneumolysin, 1500 nM CpG und 100 nM LPS führten jeweils zur maximalen NO - Freisetzung. Verglichen wurde nun jeweils die maximale Stimulation durch die einzelnen Liganden mit der maximalen Stimulation mit 100 nM LPS. Maximale Stimulation mit 6 nM Pneumolysin führte zu  $88,5 \pm 9,0 \%$ , maximale Stimulation mit CpG (1500 nM) zu  $89,1 \pm 9,9 \%$  der Stimulation mit 100 nM LPS ( $100 \pm 7,0 \%$ ,  $p > 0,05$ .) Die maximale Stimulation mit dem TLR2 - Agonisten HKAL resultierte in  $91,3 \pm 12,3\%$  der NO-Freisetzung verglichen mit 100 nM LPS ( $100 \pm 8,2\%$ ,  $p < 0,05$ ) Die NO-Freisetzung nach maximaler Stimulation von TLR2 mit  $300 \mu\text{M Pam}_3\text{Cys}$  betrug nur  $54,5 \pm 8,4 \%$  der NO - Freisetzung verglichen mit 100 nM LPS ( $100 \pm 7,9 \%$ ) ( $p < 0,001$ , \*\*\*), wahrscheinlich bedingt durch Löslichkeitsprobleme des verwendeten Liganden. In Abbildung 5 ist die NO - Freisetzung nach maximaler Stimulation von Mikrogliazellen durch LPS, Pneumolysin, CpG, Pam<sub>3</sub>Cys (P3C, n=9) und HKAL (n=11) dargestellt. Die maximale NO - Freisetzung nach Stimulation mit LPS, Pneumolysin, CpG und HKAL wiesen keine signifikanten Unterschiede auf ( $p > 0,05$ ). Die maximale Stimulation von TLR2, TLR4 und TLR9 führt also zur Freisetzung gleicher Mengen an NO.



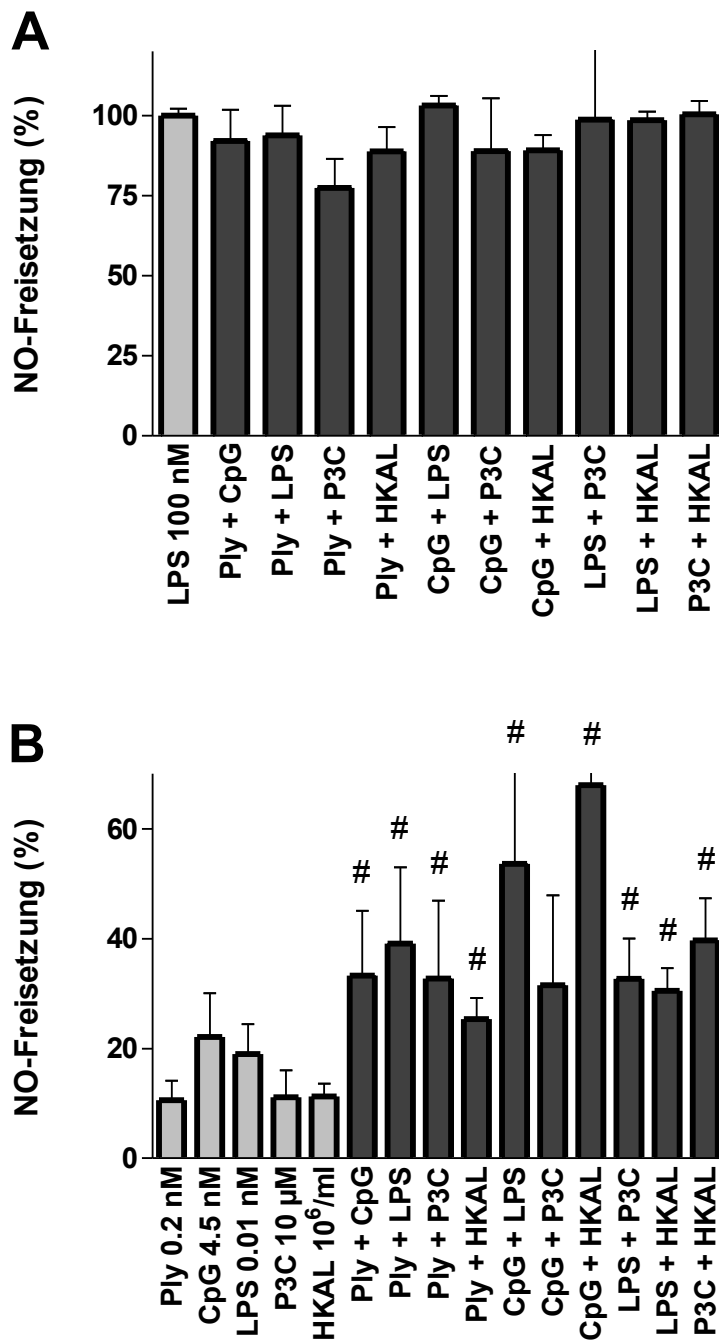
**Abbildung 5: NO - Freisetzung nach maximaler Stimulation** von Mikrogliazellen durch LPS, Pneumolysin (PLY), CpG, Pam<sub>3</sub>Cys (P3C, n=9) und HKAL (n=11). In Dosis - Wirkungs - Kurven waren vorher die Konzentrationen ermittelt worden, die zu einer maximalen NO - Freisetzung geführt hatten (Abbildung 2). Maximale Stimulation mit 6 nM Pneumolysin führte zu 88,5 ± 9,0 %, die maximale Stimulation mit CpG (1500 nM) zu 89,1 ± 9,9 %, der Stimulation mit 100nM LPS (100 ± 7,9 %, p > 0,05.) Die NO - Freisetzung nach maximaler Stimulation von TLR2 mit 300 µM Pam<sub>3</sub>Cys betrug nur 54,5 ± 8,4 % der maximalen NO - Freisetzung (p < 0,001, \*\*\*), wahrscheinlich bedingt durch Löslichkeitsprobleme des verwendeten Liganden. Die maximale Stimulation mit dem TLR2 - Agonisten HKAL resultierte in 91,3 ± 12,3 % der NO - Freisetzung verglichen mit 100 nM LPS (100 ± 8,2 %, p > 0,05). Die Daten sind als Mittelwert ±-Standardabweichung dargestellt. (Nach: Ebert et al. 2005)

### 3.6 NO - Freisetzung nach Costimulation mit zwei TLR - Agonisten

Die gleichzeitige Behandlung der Mikrogliazellen mit Konzentrationen von zwei unterschiedlichen TLR - Agonisten, welche allein jeweils zur maximalen NO - Freisetzung geführt hatten, führte zu keiner weiteren Erhöhung der NO - Freisetzung (Abbildung 6A). Dies bedeutet, dass die maximale Stimulation der Mikroglia durch nur einen TLR - Rezeptor erfolgen kann.

Es erfolgte zusätzlich eine Costimulation mit den verschiedenen TLR - Agonisten in Konzentrationen, die alleine jeweils zu einer NO - Freisetzung von etwa 30 % des Maximalwertes geführt hatten. Um zu überprüfen, ob es sich bei der NO - Freisetzung nach Costimulation mit zwei TLR - Agonisten um einen supraadditiven Effekt handelt, wurde die erwartete NO - Freisetzung der Kombination, berechnet durch die Formel nach Pösch, mit der tatsächlichen NO - Freisetzung der Kombination verglichen. Wenn der gemessene Wert statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ , ANOVA, Korrektur für wiederholtes Testen mit der Bonferroni - Methode) über dem errechneten Wert lag, definierten wir dies als einen supraadditiven Effekt. Alle in 6B dargestellten Costimulationen führten zu einer additiven NO - Freisetzung (PLY und CPG, PLY und HKAL, CPG und P3C, LPS und P3C, LPS und HKAL) oder zu einer supraadditiven NO - Freisetzung (PLY und LPS, PLY und P3C, CPG und LPS, CPG und LPS, CPG und HKAL mit jeweils  $p < 0,01$ ; P3C und HKAL mit  $p < 0,05$ ). Die Daten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

In Tabelle 1 wird die für den Fall einer synergistischen Wirkung der Substanzen erwartete NO-Freisetzung, berechnet durch die Formel nach Pösch, mit der tatsächlich gemessenen NO-Freisetzung verglichen. In Abbildung 6B wird die NO-Freisetzung nach Costimulation mit den NO-Freisetzung nach Stimulation mit den jeweiligen beiden Einzelsubstanzen verglichen. Daraus resultieren die unterschiedlichen p-Werte in Abbildung 6B und Tabelle 1.



**Abbildung 6: NO - Freisetzung nach Costimulation mit zwei TLR - Agonisten.** Gezeigt wird die NO - Freisetzung durch Mikrogliazellen nach Behandlung mit TLR - Liganden (PLY = Pneumolysin, P3C = Pam<sub>3</sub>Cys). **6A:** Verwendung von Konzentrationen, die eine maximale NO - Freisetzung auslösten, einzeln oder in Kombination. **6B:** Verwendung von Konzentrationen, die alleine eine etwa 30%ige NO - Freisetzung auslösten, einzeln oder in Kombination. Die mittlere NO - Freisetzung nach Stimulation mit 100 nM LPS wurde 100 % gleichgesetzt. Alle Costimulationen in **6B** führten zu einer additiven (PLY + CPG, PLY + HKAL, CPG + P3C, LPS + P3C, LPS + HKAL) oder zu einer supraadditiven NO - Freisetzung (PLY + LPS, PLY + P3C, CPG + LPS, CPG + HKAL, P3C + HKAL). Die Rauten (#) zeigen an, dass die NO - Freisetzung nach Costimulation sich signifikant von der NO-Freisetzung nach Stimulation mit den jeweiligen Einzelsubstanzen unterscheidet. (Nach: Ebert et al. 2005)

| <b>TLR - Agonisten<br/>(A + B)</b> | <b>E<sub>(A+B)erwartet</sub><br/>± SD (%)</b> | <b>E<sub>(A+B)gemessen</sub><br/>± SD (%)</b> | <b>p</b> | <b>ns: nicht signifikant<br/>p &lt; 0.05: *<br/>p &lt; 0.01: **</b> |
|------------------------------------|---|---|----------|---|
| Ply + CpG                          | 29,93 ± 9,40                                  | 33,28 ± 11,78                                 | 0,4      | ns  |
| Ply + LPS                          | 27,51 ± 6,15                                  | 39,10 ± 13,91                                 | 0,005    | **  |
| Ply + P3C                          | 20,38 ± 6,95                                  | 32,75 ± 14,17                                 | 0,004    | **  |
| Ply + HKAL                         | 21,55 ± 1,67                                  | 25,32 ± 3,85                                  | 0,2      | ns  |
| CpG + LPS                          | 36,45 ± 9,42                                  | 53,66 ± 16,94                                 | 0,003    | **  |
| CpG + P3C                          | 30,62 ± 10,48                                 | 31,56 ± 16,30                                 | 0,9      | ns  |
| CpG + HKAL                         | 31,24 ± 9,18                                  | 67,95 ± 2,30                                  | 0,003    | **  |
| LPS + P3C                          | 27,87 ± 7,25                                  | 32,70 ± 7,34                                  | 0,07     | ns  |
| LPS + HKAL                         | 30,50 ± 2,53                                  | 30,47 ± 4,13                                  | 0,99     | ns  |
| P3C + HKAL                         | 20,80 ± 2,49                                  | 39,69 ± 7,65                                  | 0,02     | *   |

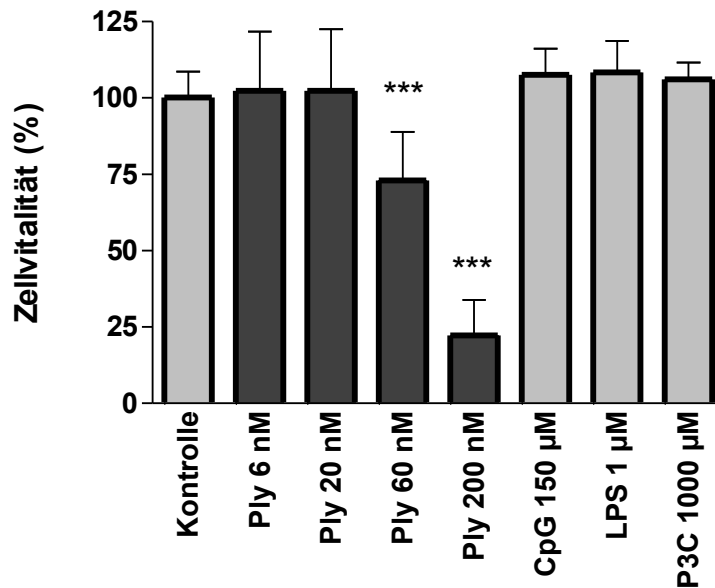
**Tabelle 1: Vergleich der NO - Freisetzung von Mikrogliazellen nach Costimulation mit zwei TLR - Liganden.** Verglichen wird die NO - Freisetzung ( $E_{(A+B)gemessen}$ ) nach Costimulation mit zwei Liganden (A und B) in submaximaler Konzentration (10-30 %) mit der entsprechenden erwarteten NO - Freisetzung ( $E_{(A+B)erwartet}$ ). Der erwartete Effekt ( $E_{(A+B)erwartet}$ ) wurde nach dem Modell des funktionellen Synergismus berechnet (Pösch 1981) (s.o.).  $E_{(A+B)erwartet}$  und  $E_{(A+B)gemessen}$  wurden verglichen mittels t-test (n=16, für TLR - Liganden - Kombinationen, die HKAL einschlossen: n=3). Die graphische Darstellung erfolgt in Abbildung 6B: Die NO - Freisetzung nach Stimulation mit 100 nM LPS wurde 100 % gleichgesetzt. P - Werte unter 0,05 gelten als statistisch relevant. Die Sternchen stehen symbolisch für p, es gilt: \*: p < 0.05; \*\*: p < 0.01. „ns“ bedeutet „nicht signifikant“.

### 3.7 Immunstimulatorische und zytotoxische Effekte von Pneumolysin

Durch die Bindung des Pneumolysins an das Cholesterol der Zellmembran, die anschließende Bildung von Oligomeren und Membranporen kommt es zur Zerstörung der Mikrogliazelle.

Niedrig dosiert wirkt Pneumolysin als Stimulator von Mikrogliazellen. Diese unterschiedlichen Effekte des Pneumolysins in Abhängigkeit zu seiner Konzentration sollten dargestellt werden. Um dies zu erreichen, wurden die durch Interferon- $\gamma$  aktivierten Mikrogliazellen für den Zeitraum von 24 Stunden unterschiedlich konzentriertem Pneumolysin ausgesetzt (0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10  $\mu\text{g/ml}$ ) (das entspricht 0,6; 2; 6; 20; 60; und 200 nM). Den toxischen zellzerstörenden Effekt beobachteten wir jeweils anhand des WST-1 - Testes und des Abfalles des NO - Gehaltes der Zellüberstände ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{g/ml}$  (60 nM). Auch in Abbildung 1C ist die Zellzerstörung durch hochkonzentriertes Pneumolysin anhand der Isolectin-B4 - Färbung deutlich sichtbar. Als Vergleich dienten Mikrogliazellen, die im gleichen Zeitraum mit lediglich Nährmedium behandelt worden waren. Bei Einsatz niedrigerer Pneumolysinkonzentrationen wurde ein Abfall der WST-1 - Messwerte nicht beobachtet, es kam aber zur Stimulation der Mikrogliazellen. Bei einer Exposition von Mikrogliazellen mit dem Toxin in einer Konzentration von 3  $\mu\text{g/ml}$  (60 nM) wurde im WST-1 - Test eine signifikante Reduktion der Zellvitalität auf 73 % im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen. Bei einer Konzentration des Pneumolysins von 10  $\mu\text{g/ml}$  (200 nM) war die Vitalität sogar signifikant auf 22 % herabgesetzt. Unter den für die vorliegende Arbeit benutzten TLR - Liganden war Pneumolysin die einzige Substanz, unter deren Einfluss ein zytotoxischer Effekt anhand des WST-1 - Testes sichtbar wurde (Abbildungen 1 und 7). Bei einer Konzentration des Pneumolysins von 0,03  $\mu\text{g/ml}$  (0,6 nM) kam es zu einer Zunahme der gemessenen NO - Freisetzung in den Extrazellulärraum um den Faktor 5,5. Das Maximum an Stimulation, eine zehnfach höhere NO - Konzentration im Überstand im Vergleich zu den Kontrollen, wurde bei einer Pneumolysin - Konzentration von 0,3  $\mu\text{g/ml}$  (6 nM) beobachtet. Eindeutige zytotoxische Effekte anhand der geringeren NO - Freisetzung waren bei Konzentrationen von 3  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 10  $\mu\text{g/ml}$  (60 nM bzw. 200 nM) zu beobachten (Abbildung 1B und 1C).



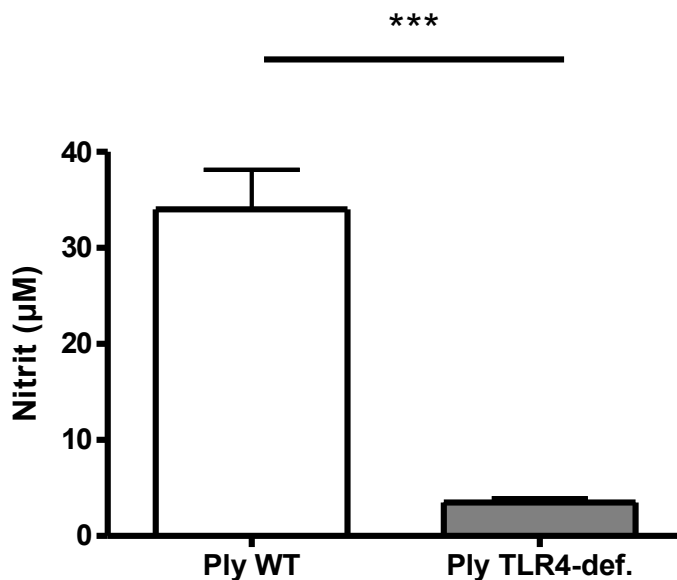


**Abbildung 7: Vergleich der Zellvitalität im WST-1 - Test.** Gezeigt werden die Vitalität von Mikrogliazellen nach Behandlung mit Pneumolysin (PLY, n=17, Daten aus vier unabhängigen Experimenten) in unterschiedlichen Konzentrationen und die Zellaktivität von Mikrogliazellen nach supramaximaler Stimulation mit CpG, LPS und Pam<sub>3</sub>Cys (P3C, n=3).

Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  - Standardabweichung dargestellt. Die nachfolgend angegebenen p-Werte beziehen sich jeweils auf den Vergleich mit der Vitalität von unbehandelten Zellen ( $100 \pm 8,5$  %; n=3). Die Behandlung mit Pneumolysin - Konzentrationen bis zu 20 nM hatte keinen Effekt auf die Zellvitalität (Pneumolysin 0.6 nM:  $102,4 \pm 19,4$  %,  $p > 0,05$ ; Pneumolysin 20 nM:  $102,3 \pm 20,2$  %,  $p > 0,05$ ). Die Behandlung mit 60 nM Pneumolysin führte zu einem Abfall der Zellvitalität auf  $73,0 \pm 15,9$  % ( $p < 0,001$ , \*\*\*). Die Behandlung mit 200 nM Pneumolysin führte zu einem Abfall der Zellvitalität auf  $22,2 \pm 11,7$  % ( $p < 0,001$ , \*\*\*). Die supramaximale Stimulation mit den anderen TLR - Agonisten führte nicht zum Abfall der Zellvitalität (150  $\mu$ M CpG:  $107,7 \pm 8,5$  %; 1  $\mu$ M LPS:  $108,3 \pm 10,4$  %; 1000  $\mu$ M Pam<sub>3</sub>Cys:  $106,1 \pm 5,5$  %;  $p > 0,05$ ). (Nach: Ebert et al. 2005)

### 3.8 NO - Freisetzung durch TLR4 - defiziente Mikrogliazellen

Zum Beweis der Wirksamkeit der Substanz Pneumolysin über TLR4 wurden Experimente an Mikrogliazellen TLR4 - defizienter Mäuse durchgeführt. Dazu wurden TLR4 - defiziente Mikrogliazellen wie oben beschrieben mit Pneumolysin in der Konzentration von 0,3 µg/ml (6 nM) behandelt. Im Anschluss wurde NO quantifiziert. Bei TLR4 - defizienten Mikrogliazellen kam es nach Behandlung mit Pneumolysin zu einer signifikant geringeren Freisetzung von NO ( $3,47 \pm 0,47 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zu Wildtypzellen ( $34,00 \pm 4,14 \mu\text{M}$ ;  $p < 0,008$ ). Diese Ergebnisse wurden in Abbildung 8 graphisch dargestellt.



**Abbildung 8: NO - Freisetzung durch TLR4 - defiziente Mikrogliazellen.** Für TLR4 - defiziente Mikrogliazellen (n=3) fällt die NO - Freisetzung nach Exposition mit den spezifischen TLR4 - Agonisten Pneumolysin PLY; 0,3 µg/ml bzw 6 nM) im Vergleich zu Mikrogliazellen mit intaktem TLR4 - Rezeptor (n=3) signifikant geringer aus ( $p < 0,01$ ; \*\*\*).

#### 4. Diskussion

TLR spielen eine entscheidende Rolle in dem System der angeborenen Erregerabwehr bei der Erkennung der "pathogenassoziierten molekularen Mustern" und leiten die schützende Immunantwort ein (Wagner 1999). Während einer Entzündung des ZNS, sei sie autoimmun oder infektiös ausgelöst, ist der Anstieg der Expression von TLR mRNA im Hirngewebe nachgewiesen worden (Nguyen et al. 2002; Böttcher et al. 2003). Dies stellt eine der Reaktionen von Abwehrzellen des ZNS auf unterschiedliche Reize dar.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte durch die Anwendung der Isolectin-B4 - Färbung an mit verschiedenen TLR - Liganden behandelten Zellen gezeigt werden, dass eine starke Stimulation der Mikrogliazellen zu morphologischen Veränderungen der Zellen führte. Die Zellen verlieren nach Stimulation ihre Zellfortsätze und runden sich ab. Dies ist konform mit den Ergebnissen von Umehara et al. (2000) und Medana et al. (2002), die ebenfalls morphologische Veränderungen von Mikrogliazellen während des Entzündungsgeschehens nachwiesen.

Bei der Betrachtung des neurologischen Schadens durch die Aktivität der Mikrogliazellen während einer ZNS - Entzündung ist die Veränderung der Nervenzellen maßgeblich. Die Schädigung von Zellleibern und -fortsätzen von Neuronen während des Entzündungsgeschehens ist ein typisches Merkmal traumatisch (Gentleman et al. 1993), infektiös (Umehara et al. 2000; Medana et al. 2002) und autoimmun (Trapp et al. 1998) bedingter Erkrankungen des ZNS. Für diesen Schaden sind Mikrogliazellen mitverantwortlich. Schon optisch beeindruckt die Tatsache, dass die Neuriten bei inflammatorischen kortikalen Läsionen von Mikrogliazellen umschlossen werden (Peterson et al. 2001). Auch korreliert die Anzahl der aktivierten Mikrogliazellen und Makrophagen positiv mit dem Ausmaß des axonalen Schadens bei Multipler Sklerose (Bitsch et al. 2000).

Die Behandlung der Mikrogliazellen mit den TLR - Agonisten LPS, Pam<sub>3</sub>Cys, CpG, Pneumolysin und HKAL hatte nach den ermittelten Ergebnissen dieser Arbeit eine Sezernierung von TNF- $\alpha$  und Nitrit zur Folge. Insoweit decken sich die Ergebnisse mit den Erkenntnissen früherer Studien (de Bock et al. 1998; Chao et al. 1992; Dawson et al. 1994). Das neurotoxische Potential der Mikrogliazellen beinhaltet die Freisetzung sowohl von NO (Chao et al. 1992; Dawson et al. 1994) als auch von TNF- $\alpha$  (de Bock et al. 1998). Auch die Sekretion des Entzündungsmediators Interleukin-2 gehört zu diesem Potential (Chao et al. 1995).

Nitrit gilt als das stabile Reaktionsprodukt von NO, welches wiederum als Entzündungsmediator im Gewebe wirkt (Boje & Arora 1992; Boje 2004). Schon längere Zeit ist bekannt, dass NO, durch Mikrogliazellen produziert, die Neuronen schädigt (Boje & Arora 1992; Chao et al, 1992). Die Aktivierung der i-NOS und die NO - Produktion sind Bestandteil vieler neuropathologischer Ereignisse (Bogdan 2001) NO spielt in der Neurodegeneration und der chronischen Entzündung eine Rolle (Gross & Wolin 1995), und NO induziert die Apoptose muriner Thymozyten (Gordon et al. 2001).

Die Höhe der NO - und TNF- $\alpha$  - Produktion kann jeweils als Maß für die Stärke der Stimulation einer Abwehrzelle herangezogen werden. LPS, Aktivator von TLR4, war nach den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit der potenteste Stimulator der Mikrogliazellen, gefolgt von Pneumolysin (TLR4 - Ligand), CpG (TLR9 - Ligand) und Pam<sub>3</sub>Cys (TLR2 - Ligand).

Möglicherweise führt die Aktivierung verschiedener TLR später in der Zelle zu unterschiedlichen Kaskaden, ein Aspekt, welcher bei der Suche nach der maßgeschneiderten Immunantwort auf das spezifische Antigen hilfreich sein kann (Underhill 2003). In den ermittelten Ergebnissen allerdings waren die beobachteten Reaktionen der Zellen nach jeweils maximaler Stimulation von TLR2, TLR4 und TLR9 relativ einheitlich: Der Anstieg der gemessenen Entzündungsparameter TNF- $\alpha$  und NO, der jeweils als quantitativer Indikator der Stimulation herangezogen wurde, war nach maximaler Aktivierung der einzelnen Rezeptoren nahezu gleich.

Aliprantis et al. zeigten, dass die Aktivierung von Rezeptoren der angeborenen Immunität sowohl zur Induktion proinflammatorischer Gene führt als auch den Zelltod bewirken können. So werden Monozyten durch bakterielles Lipoprotein über TLR2 und MyD88 gleichzeitig aktiviert und in die Apoptose getrieben (Aliprantis et al. 1999; Aliprantis et al. 2000). Ähnliche Eigenschaften wurden auch für TLR4 in Makrophagen beschrieben (Haase et al. 2003).

*In vitro* folgte der Behandlung von Cokulturen aus Neuronen und Mikrogliazellen mit dem TLR4 - Agonisten LPS und dem TLR9 - Agonisten CpG ein ausgedehntes Absterben der Neuronen, wohingegen Neuronen in Abwesenheit von Mikrogliazellen nach LPS - und CpG - Exposition keine Schädigung aufwiesen (Chao et al. 1992; Dawson et al. 1994; Bal-Price and Brown 2001; Lehnardt et al. 2003; Iliev et al. 2004). In Studien, die den Zeitablauf einer Entzündung imitierten, wurde gezeigt, dass die Schädigung der Neuronen an Axonen und Neuriten beginnt (Iliev et al. 2004).

Die residenten Makrophagen des ZNS haben neben der neuronenerstörenden Wirkung auch eine schützende Funktion. So räumen sie beispielsweise schadhafte Zellen ab oder beeinflussen die Temperatur des Gewebes (Wyss-Coray & Mucke 2002). Viele Studien deuten jedoch auf

die vorrangig neurotoxische, nicht neuroprotektive Rolle von aktivierten Mikrogliazellen hin (Kreutzberg 1996; Lehnardt et al. 2003; Iliev et al. 2004). Um eine potentielle Gewebeschädigung durch das eigene Immunsystem zu minimieren, stehen einem Organismus Strategien zur Verfügung. Beispielsweise können B- und T-Lymphozyten durch ihre eigene Aktivierung in die Apoptose getrieben werden. Dieses Phänomen ist als „aktivierungsinduzierter Zelltod“ (AICD) bekannt und ermöglicht dem Organismus, inflammatorische Prozesse zu limitieren und damit zu kontrollieren (Crispe 1999; Donjerkovic & Scott 2000). Ähnliche Strategien wurden in der Vergangenheit sowohl für Makrophagen als auch für Mikroglia beschrieben (Adler et al. 1995; Liu et al. 2001).

Bakterielle Strukturen mit der Fähigkeit, TLR zu aktivieren, werden durch eine breite Anzahl von Erregern während des spontanen Wachstums und der antibiotischen Chemotherapie freigesetzt. In der Regel stimulieren die verschiedenen Antigene eines Krankheitserregers mehr als nur einen TLR. So besitzt zu Beispiel die Zellwand des Meningitiserregers *Streptococcus pneumoniae* Zellwand Lipoteichonsäure als Agonisten von TLR2, das sezernierte Pneumolysin stimuliert TLR4 und unmethylierte CpG - Sequenzen aktivieren TLR9 (Bauer et al. 2001; Malley et al. 2003).

Nach Beginn der antibiotischen Therapie bakteriell bedingter Erkrankungen kann es zunächst zur klinischen Verschlechterung kommen: Fieber, Myalgien, Kopfschmerzen und Tachykardien treten auf. Dieses Phänomen ist als Herxheimer - Jahrish - Reaktion bekannt. Besondere Probleme bereitet die Freisetzung von Endotoxin Gram - negativer Bakterien (Hurley 1995; Gelfand et al. 1976). Eine mögliche Ursache dieses unerwünschten Effektes ist sicher in dem vermehrten Auftreten unterschiedlicher, durch die Bakterienzerstörung freigewordene TLR - Liganden, besonders LPS, zu suchen. So steigt der LPS - Gehalt nach antibiotischer Behandlung von Bakterienkulturen im Überstand auf das 100fache an (Dofferhoff et al. 1991). Ansätze für die Prävention der Jahrish - Herxheimer - Reaktion sind beispielsweise im Einsatz von TNF- $\alpha$  - Antagonisten zu suchen, der signifikant das Auftreten und die Heftigkeit der Komplikation reduziert (Fekade et al. 1996). Auch Gram - positive Bakterien enthalten proinflammatorische Komponenten wie unmethylierte CpG - ODN, Teichon- und Lipoteichonsäuren, oder Peptidoglykane und können somit wie Gram - negative Bakterien einen Septischen Schock auslösen (Sparwasser et al. 1997; De Kimpe et al. 1995). Für die zukünftige antibiotische Behandlung von Meningitiden könnte eine gleichzeitige Gabe von gut verträglichen TLR - Antagonisten von großem Nutzen sein, da die wirtsschädigende Entzündungsreaktion vermutlich geringer ausfallen würde. Ebenfalls zu beachten ist die Art des für die Meningitistherapie angewandten Antibiotikums (Nau & Eifert 2002). Ceftriaxon, das

Standardtherapeutikum für Pneumokokkenmeningitis, wirkt zum Beispiel, indem es das Bakterium lysiert. Im Gegensatz dazu wirken Rifampin und Clindamycin nicht bakteriolytisch, sondern stören die bakterielle Proteinproduktion. Im direkten Vergleich mit der Ceftriaxontherapie zeigte sich eine verminderte Freisetzung von Pneumolysin durch *S. pneumoniae* *in vivo* und *in vitro* nach Behandlung mit Rifampicin und Clindamycin. Analog dazu war die Freisetzung von Teichon- und Lipoteichonsäuren und bakterieller DNA nach Rifampicinanwendung im Vergleich zur Ceftriaxonbehandlung geringer (Spreer et al. 2003). Allein durch die Anwendung eines nichtlytischen Antibiotikums kann demnach die Konzentration proinflammatorisch wirksamer TLR - Liganden während einer Pneumokokkenmeningitis herabgesetzt werden.

Für das Verständnis des klinischen Reaktionsablaufes der Entzündung ergeben sich wichtige Fragen, die bis zu Beginn der Experimente dieser Arbeit unseres Wissens nach in der Forschung nicht berücksichtigt worden waren, da nur Versuche mit jeweils einem der Liganden unternommen wurden. Für die klinische Relevanz erschien es sinnvoll, Costimulationen von Mikrogliazellen mit zwei verschiedenen TLR - Liganden durchzuführen.

Unklar war, ob die alleinige maximale Aktivierung eines TLR durch einen spezifischen Liganden in Mikrogliazellen die gleiche NO - Freisetzung wie die gleichzeitige maximale Aktivierung zweier TLR auslöste. Desweiteren war nicht bekannt, ob eine Anwendung der Liganden in submaximal stimulierender Dosierung an Mikrogliazellen einen additiven, supraadditiven oder potenzierenden Effekt der NO - Freisetzung bewirkte. Nach den ermittelten Ergebnissen lassen sich nun folgende Aussagen treffen:

1. Die simultane Behandlung von Mikrogliazellen mit zwei Agonisten verschiedener TLR in Konzentrationen, welche, allein verwendet, eine maximale NO - Freisetzung bewirkten, führte nicht zu einem weiteren Anstieg der NO - Sekretion.
2. Gleichzeitige Anwendung derselben Substanzen in submaximal stimulierender Konzentration resultierte in einem additiven bzw. supraadditiven Effekt für die NO - Freisetzung.

Dieses Ergebnis ist konform mit dem *in-vitro* - Verhalten von Makrophagen nach gleichzeitiger Stimulation mit mehreren TLR - Agonisten, welche eine erhöhte Sensitivität von Immunzellen auf niedrigdosierte mikrobielle Produkte bewirkte (Hume et al. 2001; Dalpke et al. 2002).

Im Falle einer Infektion des ZNS, speziell der bakteriellen Meningitis, erreichen mikrobielle Produkte mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit den Extrazellulärraum des Gehirnes, weil das ventrikuläre Ependym, welches den Liquorraum vom Extrazellulärraum des Gehirnes trennt, keine funktionierende Diffusionsbarriere zwischen Liquor und der extrazellulären Flüssigkeit des Hirngewebes darstellt (Reese & Karnovsky 1967). Aus diesem Grunde führen LPS - oder

CpG - Injektionen in die cerebrospinale Flüssigkeit von Kaninchen oder Mäusen zu den gleichen Effekten wie die Meningitis selber, nämlich zu einer Aktivierung der Makrophagen und zur Zytokinproduktion (Kartalija et al. 1995; Schluesener et al. 2001; Deng et al. 2001).

Im Gegensatz dazu stellen die Blut - Liquor - Schranke und die Blut - Hirn - Schranke, also das Epithel des *Plexus choroideus* sowie die Endothelzellen der Hirngefäße, ein großes Hindernis für die Passage von großen und bzw. oder hydrophilen Molekülen vom Blut in die Kompartemente des ZNS dar (Davson et al. 1987). Diese Tatsache ist der Grund dafür, dass das Hirngewebe glücklicherweise während der Mehrzahl der extracerebralen Infektionen durch die Blut - Hirn - Schranke und Blut - Liquor - Schranke wahrscheinlich ausreichend vor dem Eindringen mikrobieller Produkte geschützt ist. Septische Infektionen mit sehr hohen Konzentrationen an mikrobiellen Produkten in der systemischen Zirkulation können jedoch von dieser Regel eine Ausnahme bilden, sie können das Hirngewebe erreichen. Aus diesem Grunde sollte erforscht werden, ob die Stimulation von TLR an der Pathogenese der Septischen Enzephalopathie beteiligt ist, die zu Bewußtseinsstörungen und fokalen neurologischen Abnormalitäten führt. Auch von Infektionen im Liquorraum ist das Hirngewebe natürlich mitbetroffen, da weder Blut - Hirn - Schranke noch Blut - Liquor - Schranke einen Schutz bieten.

Die systemische Gabe bakterieller Produkte steigert die lokale Entzündungsreaktion nach neuronaler Schädigung (Bohatschek et al. 2001). TLR interagieren auch mit endogenen Liganden: Die Aktivierung der Mikrogliazellen nach Exposition von Hitze - Schock - Proteinen zum Beispiel, die zu einem Anstieg von Phagozytose und Abbau von Amyloid- $\beta$  führt, wird durch TLR4 vermittelt (Ohashi et al. 2000; Kakimura et al. 2002). Darüber hinaus wird ein Teil des körpereigenen Adhäsionsmoleküles Fibronectin ebenfalls durch TLR4 erkannt (Okamura et al. 2001), und Komplexe aus Wirts - DNA und Immunglobulinen interagieren mit TLR9 (Leadbetter et al. 2002). Die Applikation von A $\beta$  induziert zum einen die NO - Produktion durch Mikrogliazellen, zum anderen die Neurotoxizität in Cokulturen von Nervenzellen und Mikrogliazellen über die Wirkung am LPS - Rezeptor (Ii et al. 1996; Fassbender et al. 2004). TLR - Liganden, die vom Wirt selber stammen, welche normalerweise nicht der durch Rezeptoren an Zelloberflächen erkannt werden, weil sie intrazellulär vorkommen, können durch Gewebeschäden, beispielsweise nach Traumen oder während akuter Entzündungen, freigesetzt werden. Die Aktivierung der TLR spielt also möglicherweise eine bedeutende Rolle in autoimmun bedingten neurodegenerativen oder entzündlichen Krankheiten des ZNS, und die synergistische Aktivierung der TLR durch mikrobielle und endogene Liganden könnte die molekulare Basis für die regelmäßig beobachteten Exazerbationen von autoimmunen und

neurodegenerativen Erkrankungen nach systemischen Infektionen darstellen (Perry et al. 2003). Auf einige Ergebnisse der vorliegenden Studie konnten Lotz et al. 2005 aufbauen. Sie behandelten murine Mikrogliazellen *in vitro* mit Amyloid- $\beta$  und TLR - Liganden in Konzentrationen, die nach den oben vorgestellten Ergebnissen 20 bis 30 % der maximal möglichen NO - Produktion bewirkt hatten, allein und in Kombination. Hier zeigte sich für die NO- und TNF- $\alpha$ - Produktion jeweils ein additiver Effekt bei der simultanen Gabe von Amyloid- $\beta$  und Pam<sub>3</sub>Cys wie bei der gleichzeitigen Behandlung mit Amyloid- $\beta$  und LPS, nicht jedoch für Amyloid- $\beta$  und CpG. Das ist ein möglicher Grund für die regelmäßig bei Alzheimerpatienten beobachtete klinische Verschlechterung während einer Infektion. (Lotz et al. 2005).

Bei niedrigen Konzentrationen im Bereich Nanogramm pro Milliliter verursacht Pneumolysin zelluläre Fehlfunktionen wie zum Beispiel die Verminderung der Frequenz des Zilienschlages im respiratorischen (Feldman et al. 1990) oder im ependymialen Epithel (Hirst et al. 2000; Hirst et al. 2002). Eine Störung der Funktion von Immunzellen ist ebenfalls durch niedrigdosiertes Pneumolysin beobachtet worden (Mitchell and Andrew 1997). Pneumolysin in Konzentrationen von mehr als 1,67 ng/ml läßt den Einstrom von Kalziumionen in neutrophile Granulozyten ansteigen und stimuliert deren Produktion von Superoxid unter Einfluß des chemotaktischen Tripeptides FMLP (Cockeran et al. 2001). Die Aktivierung von Makrophagen durch Pneumolysin erfolgt über TLR4 (Malley et al. 2003). Zusätzlich zu seiner immunstimulatorischen Funktion wirkt Pneumolysin direkt zytotoxisch auf neuronale Zellen (Braun et al. 2002; Stringaris et al. 2002) und auf andere Zellen des zentralen Nervensystemes, wie Ependymzellen oder Mikrogliazellen. Auch Ganglienzellen im Innenohr gehen durch das Toxin zugrunde (Hirst et al. 2000; Winter et al. 1997). Die Sensitivität der unterschiedlichen Zelltypen variiert, sie scheint von der Struktur und der Dynamik der Plasmamembran abhängig zu sein (Hirst et al. 2002). Monozyten und pulmonale endotheliale Zellen werden durch hochkonzentriertes Pneumolysin in Konzentrationen über 10 ng/ml geschädigt (Rubins et al. 1992). Sowohl die immunstimulierende als auch die zytotoxische Funktion des Pneumolysins konnten in dieser Arbeit erneut eindeutig dargestellt werden. So kam es bei einer Behandlung von Mikrogliazellen mit Pneumolysin mit einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml zur in der Isolectin-B4 - Färbung gut sichtbaren Zellzerstörung. Die maximale Freisetzung von NO nach Pneumolysinexposition durch Mikrogliazellen erfolgte bei Konzentrationen von 0,3  $\mu$ g/ml. Höhere Konzentrationen bewirkten einen Abfall der NO - Freisetzung aus der Zelle. Dies ist durch den zerstörenden Effekt von Pneumolysin bedingt. Nicht zuletzt beweisen die Daten des WST-1 - Testes den pneumolysininduzierten Untergang von Mikrogliazellen. Anders



als nach der Pneumolysinstimulation konnte nach der supramaximalen Stimulationen der Mikrogliazellen durch die anderen verwendeten TLR - Agonisten, also LPS, CpG, Pam<sub>3</sub>Cys und HKAL kein Nachlassen der Zellvitalität anhand der oben genannten Parameter festgestellt werden.

Die Eigenschaft von Pneumolysin und LPS als potente TLR4 - Liganden konnte in den durchgeführten Experimenten an TLR4 - defizienten Mäusen erneut bestätigt werden. Nach Behandlung von Mikrogliazellen mit niedrigdosiertem Pneumolysin kam es bei TLR4 - defizienten Zellen im Vergleich zu Mikrogliazellen mit intaktem TLR4 zu einer geringeren Freisetzung von NO. Auch die Behandlung mit LPS führte bei Zellen mit funktionierendem TLR4 im Vergleich mit TLR4 - defizienten Zellen zur höheren NO - Freisetzung. Dies bestätigt bisherige Forschungsergebnisse, anhand derer die Wirksamkeit von LPS und Pneumolysin über TLR4 festgestellt wurde (Malley et al. 2003).

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung der Behandlung muriner Mikrogliazellen mit Agonisten von TLR2, TLR4 und TLR9 untersucht. Zu diesem Zweck wurden erstmals in unserer Arbeitsgruppe murine Mikrogliazellkulturen angelegt. Als TLR - Agonisten dienten Pam<sub>3</sub>Cys und HKAL (TLR2), Pneumolysin und LPS (TLR4) sowie CPG (TLR9). Die Stimulation muriner Mikrogliazellen mit den verschiedenen TLR - Agonisten führte zur Freisetzung von NO und TNF- $\alpha$ . Durch den Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen der TLR - Agonisten konnten Dosis - Wirkungs - Kurven für die Freisetzung von NO und TNF- $\alpha$  erstellt werden. Anhand der EC<sub>50</sub> wurde die Potenz der TLR - Liganden beurteilt. Für die Freisetzung von NO wies LPS die höchste stimulatorische Potenz auf, gefolgt von Pneumolysin, CpG und Pam<sub>3</sub>Cys. Für die TNF- $\alpha$  - Freisetzung besaß ebenfalls LPS die höchste stimulatorische Potenz, auch hier folgten Pneumolysin und CpG. Das verwendete Pam<sub>3</sub>Cys löste sich nicht optimal, vermutlich aus diesem Grund wurde durch die Pam<sub>3</sub>Cys - Gabe keine maximale Stimulation erreicht. Darum konnte die EC<sub>50</sub> für die TNF- $\alpha$  - Freisetzung für Pam<sub>3</sub>Cys nicht ermittelt werden.

Die EC<sub>50</sub> für die TNF- $\alpha$  - Freisetzung war jeweils höher als die entsprechende EC<sub>50</sub> für die Freisetzung von NO. Die Behandlung mit HKAL führte zur starken NO - und TNF- $\alpha$  - Freisetzung. Ein direkter Vergleich der Potenz von HKAL mit der der anderen Liganden ist nicht möglich, da die Konzentration von HKAL in Zellzahl pro ml gemessen wird. Die Konzentrationen von Pam<sub>3</sub>Cys, Pneumolysin und LPS werden jedoch in  $\mu\text{g/l}$  gemessen.

Die Stimulation von Mikrogliazellen über verschiedene TLR hatte eine relativ gleich starke Sezernierung von NO und TNF- $\alpha$  zur Folge.

Die Costimulation der Mikrogliazellen mit Konzentrationen von zwei unterschiedlichen TLR - Agonisten, welche allein jeweils zur maximalen NO - Produktion geführt hatten, resultierte nicht in einer weiteren Erhöhung der NO - Freisetzung.

Niedrig dosiert zeigte die Pneumolysinbehandlung einen immunstimulatorischen Effekt. Das Maximum an Stimulation, gemessen an der Zunahme der NO - Produktion, wurde bei einer Pneumolysin - Konzentration von 0,3  $\mu\text{g/ml}$  (6nM) beobachtet. Eindeutige zytotoxische Effekte anhand der signifikant geringeren NO - Freisetzung waren bei Konzentrationen von 3  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 10  $\mu\text{g/ml}$  (60 nM bzw. 200 nM) nachweisbar. Durch die Isolectin-B4 - Färbung wurden bei diesen Konzentrationen pneumolysinbedingte Zellschäden dargestellt. Bei den anderen Substanzen wurde in hohen Konzentrationen keine Zytotoxizität beobachtet

Die Behandlung TLR4 - defizienter Mikrogliazellen mit den spezifischen TLR4 - Agonisten Pneumolysin und LPS führte zu einer signifikant geringeren Freisetzung von NO im Vergleich zu Wildtypzellen.

Schlussfolgernd kann gesagt werden: Die Stimulation von Mikrogliazellen über unterschiedliche TLR resultiert in einer relativ einheitlichen Freisetzung von NO und TNF- $\alpha$ . Die gleichzeitige Stimulation mit zwei jeweils niedrigdosierten TLR - Agonisten führt zu einem additiven oder supraadditiven Effekt. Nicht nur bakterielle Substanzen, sondern auch endogene Stoffe sind Agonisten an TLR - Rezeptoren. Der additive Effekt durch die simultane Stimulation mehrerer TLR erhöht nicht nur die Sensitivität von Mikroglia während Infektionen, sondern kann ebenfalls Wechselwirkungen zwischen exogenen und endogenen Agonisten von TLR zur Folge haben. Dies kann ein Grund für die Exazerbation oder Induktion autoimmuner Krankheiten durch Infektionen sein.

## 6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abb. 1: Isolectin-B4 - Färbung und Hämalaun - Gegenfärbung von Mikrogliazellen                           | 27 |
| Abb. 2: Dosis - Wirkungs - Kurven für die NO - Freisetzung   | 29 |
| Abb. 3: Dosis - Wirkungs - Kurven für die TNF- $\alpha$ - Freisetzung                                    | 30 |
| Abb. 4: Relative stimulatorische Potenz  | 32 |
| Abb. 5: NO - Freisetzung nach maximaler Stimulation  | 34 |
| Abb. 6: NO - Freisetzung nach Costimulation mit zwei TLR - Agonisten                                     | 36 |
| Abb. 7: Vergleich der Zellvitalität im WST-1 - Test  | 39 |
| Abb. 8: NO - Freisetzung durch TLR4 - defiziente Mikrogliazellen   | 40 |
| Tabelle 1: Vergleich der NO - Freisetzung von Mikrogliazellen nach Costimulation mit zwei TLR - Liganden | 37 |

## 7. Literaturverzeichnis

Aderem A, Ulevitch RJ (2000): Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406(6797), 782 - 787

Adler B, Adler H, Jungi TW, Peterhans E (1995): Interferon-alpha primes macrophages for lipopolysaccharide-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 921 - 927

Akira S, Sato S (2003): Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand J Infect Dis* 35(9), 555 - 562

Alcantara RB, Preheim LC, Gentry-Nielsen MJ (2001) Pneumolysin-induced complement depletion during experimental pneumococcal bacteremia. *Infect Immun* 69, 3569 - 3575

Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A (1999): Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285, 736 - 739

Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A (2000): The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *Embo J* 19, 3325-3336

Bal-Price A, Brown GC (2001): Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci* 21, 6480 - 6491

Banati RB, Kreutzberg GW (1993): Flow cytometry: measurement of proteolytic and cytotoxic activity of microglia. *Clin Neuropathol* 12(5), 285 - 288

Bannerman, DD, Goldblum, SE (1999). Direct effects of endotoxin on the endothelium: barrier function and injury. *Lab Invest.* 79, 1181-1199

Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB (2001): Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 9237 - 9242

Billington SJ, Jost BH, Songer JG (2000): Thiol-activated cytolysins: structure, function and role in pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* 182, 197 - 205

Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W (2000): Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123, 1174 - 1183

Böttcher T, von Mering M, Ebert S, Meyding-Lamade U, Kuhnt U, Gerber J, Nau R. (2003): Differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in experimental murine central nervous system infections. *Neurosci Lett* 344(1), 17 - 20

Bogdan C (2001): Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2, 907

Bohatschek M, Werner A, Raivich G (2001): Systemic LPS injection leads to granulocyte influx into normal and injured brain: effects of ICAM-1 deficiency. *Exp Neurol* 172(1), 137 - 152

Boje K (2004): Nitric oxide neurotoxicity in neurodegenerative diseases. *Front Biosci* 9, 763 - 776

Boje K, Arora P (1992): Microglial-produced nitrid-oxide and nitrogen oxides mediate neuronal cell des. *Brain Res* 587, 250 - 256

Bowie A, O'Neill L (2000): The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 67(4), 508 - 514

Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, Weber JR (2002): Pneumococcal pneumolysin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest* 109, 19 - 27

Bremner P, Heinrich M (2002): Natural products as targeted modulators of the nuclear factor-kappaB pathway. *J Pharm Pharmacolog* 54, 453 - 472

Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK (1992): Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 149, 2736 - 2741

Chao, CC Hu, S Ehrlich, L, Peterson, PK, (1995): Interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-d-aspartate receptors. *Brain Behav Immun* 9, 355 - 365

Cockeran R, Theron AJ, Steel HC, Matlola NM, Mitchell TJ, Feldman C, Anderson R. (2001): Proinflammatory interactions of pneumolysin with human neutrophils. *J Infect Dis* 183, 604 - 611

Colin K. Combs J, Colleen K, Shih-Chu K, Landreth GE (2001):  $\beta$ -Amyloid Stimulation of Microglia and Monocytes Results in TNF $\alpha$ -Dependent Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Neuronal Apoptosis. *J Neurosci* 21(4), 1179 - 1188

Crispe IN (1999): Death and destruction of activated T lymphocytes. *Immunol Res* 19: 143 - 157

Dalpke AH, Frey M, Morath S, Hartung T, Heeg K. (2002): Interaction of lipoteichoic acid and CpG-DNA during activation of innate immune cells. *Immunobiology* 206, 392 - 407

Davson H, Welch K, Segal MB.: Physiology and pathophysiology of the cerebrospinal fluid. Churchill Livingstone, Edinburgh – London, Great Britain, 1987

Dawson VL, Brahmabhatt HP, Mong JA, Dawson TM. (1994): Expression of inducible nitric oxide synthase causes delayed neurotoxicity in primary mixed neuronal-glial cortical cultures. *Neuropharmacology* 33, 1425 - 1430

de Bock F, Derijard B, Dornand J, Bockaert J, Rondouin G. (1998): The neuronal death induced by endotoxic shock but not that induced by excitatory amino acids requires TNF- $\alpha$ . *Eur J Neurosci* 10, 3107 - 3114

del Rio-Hortega PD: Microglia; in: Cytology and cellular pathology of nervous system; Penfield W (editor); P. B. Höber; New York 1932; 481 - 534

De Kimpe SJ, Kengatharan M, Thiemermann C, Vane JR (1995): The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc Nat Acad Sci USA* 92, 10359 - 10363

Deng GM, Liu ZQ, Tarkowski A. (2001): Intracisternally localized bacterial DNA containing CpG motifs induces meningitis. *J Immunol* 167, 4616 - 4626

Dickson DW, Lee SC, Mattiace LA, Yen SH, Brosnan C. (1993): Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* 7(1), 75 - 83

Djukic M, Mildner A, Schmidt H, D. Czesnik, W. Brück, J. Priller, Nau R, Prinz RM (2006): Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain* 129, 2394 - 2403

Dofferhoff AS., Nijland JH, de Vries-Hospers HG, Mulder PO, Weits J, Bom VJ (1991): Effects of different types and combinations of antimicrobial agents on endotoxin release from gram-negative bacteria: an in-vitro and in-vivo study. *Scand J. Infect Dis* 2, 745 - 754

Donjerkovic D, Scott DW (2000): Activation-induced cell death in B lymphocytes. *Cell Res* 10, 179 - 192

Ebert S, Gerber J, Bader S, Mühlhauser F, Brechtel K, Mitchell TJ, Nau R (2005): Dose-dependent activation of microglial cells by Toll-like receptor agonists alone and in combination. *J Neuroimmunol* 159(1-2), 78 - 96

Fassbender K, Walter S, Kuhl S, Landmann R, Ishii K, Bertsch T, Stalder AK, Muehlhauser F, Liu Y, Ulmer AJ et al. (2004): The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J* 18(1), 203 - 5

Fekade D, Knox K, Hussein K, Melka A, Lalloo DG, Coxon RE, and Warrell DA (1996): Prevention of Jarisch–Herxheimer Reactions by Treatment with Antibodies against Tumor Necrosis Factor. *N Engl J Med* 335(5), 311 - 315



Feldman C, Mitchell TJ, Andrew PW, Boulnois GJ, Read RC, Todd HC, Cole PJ, Wilson R. (1990): The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. *Microb Pathog* 9, 275 - 284

Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M (2005): Alzheimer's Disease International et al.: Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366, Nr. 9503, 2112 - 2117

Gelfand JA, Elin RJ, Berry FW Jr, Frank MM (1976): Endotoxemia associated with Jarisch-Herxheimer reaction. *N Engl J Med* 295, 211 - 213

Gentleman SM, Nash MJ, Sweeting CJ, Graham DI, Roberts GW (1993): Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neurosci Lett* 160, 139 - 144

Gordon, SA, Abou-Jaoude W, Hoffman RA, McCarthy SA, Kim YM, Zhou X, Zhang XR, Simmons RL, Chen Y, Schall L, Ford. HR (2001): Nitric oxide induces murine thymocyte apoptosis by oxidative injury and a p53-dependent mechanism. *J Leukocyte Biol.* 70, 87

Gross SS, Wolin. MS (1995): Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 57, 737

Haase R, Kirschning CJ, Sing A, Schrottner P, Fukase K, Kusumoto S, Wagner H, Heesemann J, Ruckdeschel K (2003): A dominant role of Toll-like receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteria-faced macrophages. *J Immunol* 171, 4294 - 4303

Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, Wilson CB (2001): Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* 166(1), 9 - 15

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001): The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410(6832), 1099 - 1103

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408(6813), 659 - 660

Hertz CJ, Kiertcher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV, Roth MD, Modlin RL (2001): Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 166(4), 2444 - 2450

Hirst RA, Rutman A, Sikand K, Andrew PW, Mitchell TJ, O'Callaghan C (2000): Effect of pneumolysin on rat brain ciliary function: comparison of brain slices with cultured ependymal cells. *Pediatr Res* 47, 381 - 384

Hirst RA, Yesilkaya H, Clitheroe E, Rutman A, Dufty N, Mitchell TJ, O'Callaghan C, Andrew PW (2002): Sensitivities of human monocytes and epithelial cells to pneumolysin are different. *Infect Immun* 70(2), 1017 - 1022

Ho PP, Fontoura P, Pedro J, Ruiz PJ, Steinman L, Garren H (2003): An Immunomodulatory GpG Oligonucleotide for the Treatment of Autoimmunity via the Innate and Adaptive Immune Systems. *J Immunol*, 171, 4920 - 4926

Hoffmann P, Heinle S, Schade UF, Loppnow H, Ulmer AJ, Flad HD, Jung G, Bessler WG (1988) Stimulation of human and murine adherent cells by bacterial lipoprotein and synthetic lipopeptide analogues. *Immunobiology* 177(2), 158 - 170

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S (1999): Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162(7), 3749 - 3752

Hume DA, Underhill DM, Sweet MJ, Ozinsky AO, Liew FY, Aderem A (2001): Macrophages exposed continuously to lipopolysaccharide and other agonists that act via toll-like receptors exhibit a sustained and additive activation state. *BMC Immunol* 2, 11 - 32

Hurley JC (1995): Antibiotic-induced release of endotoxin. A therapeutic paradox. *Drug Saf* 12, 183 - 195

Li M, Sunamoto M, Ohnishi K, Ichimori Y (1996): Beta-amyloid protein-dependent nitric oxide production from microglial cells and neurotoxicity. *Brain Res* 720, 93 - 100

Iliev AI, Stringaris AK, Nau R, Neumann H (2004): Neuronal injury mediated via stimulation of microglial toll-like receptor-9 (TLR9). *FASEB J* 18(2), 412 - 414

Jedrzejewski MJ (2001): Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. *Microbiol Mol Biol Rev* 65(2), 187 - 207

Kakimura J, Kitamura Y, Takata K, Umeki M, Suzuki S, Shibagaki R, Taniguchi T, Nomura Y, Gebicke-Haerter PJ, Smith MA, Perry G, Shimohama S (2002): Microglial activation and amyloid-beta clearance induced by exogenous heat-shock proteins. *FASEB J* 16, 601 - 603

Kandamilla ER, Bhagat L, Yu D, Cong Y, Tang JY, Agrawal S (2002): Conjugation of ligands at the 5'-end of CpG DNA affects immunostimulatory activity. *Bioconjug Chem* 13, 966 - 974

Kandamilla ER, Zhu FG, Bhagat L, Yu D, Agrawal S (2003): Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG dans. *Biochemical Society Transactions* 31(3), 654 - 658

Kartalija M, Kim Y, White ML, Nau R, Tureen JH, Täuber MG (1995): Effect of a recombinant N-terminal fragment of bactericidal / permeability-increasing protein (rBPI23) on cerebrospinal fluid inflammation induced by endotoxin. *J Infect Dis* 171, 948 - 953

Kelly SJ, Jedrzejewski MJ (2000): Structure and molecular mechanism of a functional form of pneumolysin: a cholesterol-dependent cytolysin from *Streptococcus pneumoniae*. *J Struct Biol* 132, 72 - 81

Kimbrell DA, Beutler B (2001): The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet* 2(4), 256 - 267

Kreutzberg GW (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci 19, 312 - 318

Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman (1995): DM.CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. Nature 374(6522), 546 - 549

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

Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT (2004): TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. Nat Immunol 5: 190 - 198

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

Lehnardt S, Massillon L, Follet P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg P, Volpe JJ, Vartanian T. 2003. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. Proc Natl Acad Sci USA 100, 8514 - 8519

Ling EA, Wong WC (1993): The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. Glia 7(1), 9 - 18

Liu B, Wang K, Gao HM, Mandavilli B, Wang JY, Hong JS (2001): Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. J Neurochem 77, 182 - 189

Lotz M, Ebert S, Esselmann H, Illiev AI, Prinz M, Wiazewicz N, Wildfang J, Gerber J, Nau R (2005): Amyloid beta peptide 1-40 enhances the action of Toll-like receptor-2 and -4 agonists but antagonizes Toll-like receptor-9-induced inflammation in primary mouse microglial cell cultures. J Neurochem 94, 289 - 298

Lüderitz O, Galanos C, Lehmann V, Mayer H, Rietschel ET, Weckesser J (1978): Chemical structure and biological activities of lipid A's from various bacterial families. *Naturwissenschaften* 65(11), 578 - 585

Malley R, Hennecke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT (2003): Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 1966 - 1971

Manzel L, Macfarlane DE (1999): Lack of immune stimulation by immobilized CpG-oligodeoxynucleotide. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9, 459 - 464

McGeer PL, Kawamata T, Walker DG, Akiyama H, Tooyama I, McGeer EG (1993): Microglia in degenerative neurological disease. *Glia* 7(1), 84 - 92

Medana IM, Day NP, Hien TT, Mai NT, Bethell D, Phu NH, Farrar J, Esiri MM, White NJ, Turner GD (2002): Axonal Injury in Cerebral Malaria. *Am J Pathol* 160, 655 - 666

Medzhitov R, Preston Hurlburt P, Janeway CA (1998): A human homologue of the drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394 - 397

Meshulam, T, Levitz SM, Christin L, Diamond RD (1995): A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT). *J Infect Dis* 172, 1153 - 1156

Mildner A, Schmidt H, Nitsche, Merkler D, Hanisch U, Mack M, Heikenwalder M, Brück W, Priller J, Prinz M (2007): Microglia in the adult brain arise from Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 10, 1544 - 1553

Mitchell TJ, Andrew PW (1997): Biological properties of pneumolysin. *Microb Drug Resist* 3 19 - 26

Nau R, Brück W (2002): Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci* 25, 38 - 45

Nau R, Eiffert H (2002): Modulation of Release of Proinflammatory Bacterial Compounds by Antibacterials: Potential Impact on Course of Inflammation and Outcome in Sepsis and Meningitis. *Clin Microbiol Rev*, 15(1), 95 - 110

Nguyen MD, Julien JP, Rivest S (2002): Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 3 216 - 227

Ohashi KV, Burkart V, Flohe S, Kolb H (2000): Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164, 558 - 561

Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF 3rd. (2001): The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276(13), 10229 - 10233

O'Neill LAJ (2003): The role of MyD88-like adapters in Toll-like receptor signal transduction. *Biochem Soc Trans* 31(3): 643 - 647

O'Neill LAJ, Greene C (1998): Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 63, 650 - 657

Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A (2000): The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(25), 13766 - 13771

Paton JC, Lock RA, Hansman DJ (1983): Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 40, 548 - 552

Paton JC, Berry AM, Lock RA, Hansman DJ, Manning PA (1986): Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding pneumolysin. *Infect Immun* 54, 50 - 55

Paton JC, Andrew PW, Boulnois GJ, Mitchell TJ (1993): Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu Rev Microbiol* 47, 89 - 115

Perry VH, Gordon S (1988): Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 11(6), 273 - 277

Perry VH, Newman TA, Cunningham C (2003): The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 4, 103 - 112

Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp BD (2001): Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 50, 389 - 400

Pösch G (1981): Quantitative Ermittlung potenzierender oder hemmender Kombinationswirkungen gleichsinnig wirkender Pharmaka-Vorteile einer Dosis-Wirkungs-Kurven-Methode gegenüber der Isobolen- Methode. *Arzneimittelforschung/Drug Res* 31, 1135 - 1140

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M Galanos C (1998): Defective LPS signalling in C3H/HeJ and 57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282, 2085-2088

Rayner CFJ, Jackson AD, Rutman A (1995): Interaction of pneumolysin-sufficient and -deficient isogenic variants of *Streptococcus pneumoniae* with human respiratory mucosa. *Infect Immun* 63, 422-427

Reese TS, Karnovsky MJ (1967): Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34, 207-217

Rosjohn J, Gilbert RJ, Crane D, Morgan PJ, Mitchell TJ, Rowe AJ, Andrew PW, Paton JC, Tweten RK, Parker MW (1998): The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* 284, 449 - 461

Rubins JB, Janoff EN (1998): Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. *J. Lab Clin Med* 131, 21 - 27

Rubins JB, Duane PG, Charboneau D, Janoff EN (1992): Toxicity of pneumolysin to pulmonary endothelial cells in vitro. *Infect Immun* 60, 1740 - 1746

Saez-Llorenz X and Mc Cracken GH (2003): Bacterial meningitis in children. *Lancet* 361(9375), 2139 - 2148

Sarkar SN, Smith HL, Rowe TM, Sen GC (2003): Double-stranded RNA signaling by Toll-like receptor 3 requires specific tyrosine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 278(7), 4393 - 4396

Schluesener HJ, Seid K, Deininger M, Schwab J (2001): Transient in vivo activation of rat brain macrophages/microglial cells and astrocytes by immunostimulatory multiple CpG oligonucleotides. *J Neuroimmunol* 113, 89 - 94

Schumann, RR., Leong, SR, Flaggs, GW, Gray, PW, Wright, SD, Mathison, JC, Tobias, PS, Ulevitch, RJ, (1990): Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249, 1429 - 1431

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR (1988): Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 48(17), 4827 - 4833

Seifert R, Schultz G, Richter-Freund M, Metzger J, Wiesmuller KH, Jung G, Bessler WG, Hauschildt S (1990): Activation of superoxide formation and lysozyme release in human neutrophils by the synthetic lipopeptide Pam<sub>3</sub>Cys -Ser-(Lys)<sub>4</sub>. Involvement of guanine-



nucleotide-binding proteins and synergism with chemotactic peptides. *Biochem J* 267(3), 795 - 802

Simard AR, Rivest S (2004): Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J* 18(9), 998 - 1000

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

Spreer A, Kerstan H, Böttcher T, Gerber J, Siemer A, Zysk G, Mitchell TJ, Eiffert H, Nau R (2003): Reduced Release of Pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae* In Vitro and In Vivo after Treatment with Nonbacteriolytic Antibiotics in Comparison to Ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(8), 2649 - 2654

Streit WJ (1990), An improved staining method for rat microglial cells using the lectin from *Griffonia simplicifolia* (GSA I-B4). *J Histochem Cytochem* 38(11), 1683 - 1686

Streit WJ, Kincaid-Colton CA (1995): The brain's immune system. *Sci Am* 273(5), 54 - 61

Stringaris AK, Geisenhainer J, Bergmann F, Balshusemann C, Lee U, Zysk G, Mitchell TJ, Keller BU, Kuhnt U, Gerber J, Spreer A, Bahr M, Michel U, Nau R (2002): Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurobiol Dis* 11(3), 355 - 368

Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, & Beutler B (2004): Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 3516 - 3521

Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, Ishii KJ, Takeshita S, Gursel M, Klinman DM (2001): Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol* 167(7), 3555 - 3558

Takeshita S, Takeshita F, Haddad DE, Janabi N, Klinman DM (2001): Activation of microglia and astrocytes by CpG oligodeoxynucleotides. *Neuroreport* 12, 3029 - 3032

Tapping, RI, Akashi, S; Miyake, K; Godowski, PJ und Tobias, PS. (2000): Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for escherichia and salmonella lipopolysaccharides, *J Immunol* 165, 5780 - 5787

Thomas WE (1992): Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Brain Res Rev* 17(1), 61 - 74

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L (1998): Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338, 278 - 285

Ulmer AJ, Heine H, Feist W, Kusumoto S, Kusama T, Brade H, Schade U, Rietschel ET, Flad HD (1992): Biological activity of synthetic phosphonoxyethyl analogs of lipid and lipid A partial structures. *Infect Immun* 60(8), 3309 - 3314

Umehara F, Abe M, Koreeda Y, Izumo S, Osame M. (2000): Axonal damage revealed by accumulation of beta-amyloid precursor protein in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neurol Sci* 176, 95 - 101

Underhill DM (2003): Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol* 33, 1767 - 1775

van de Beek D, de Gans J, Tunkel AR, Wijdicks EF (2006): Community-acquired bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med* 354(1), 44-53

Van Uden J, Raz E (2000): Introduction to immunostimulatory DNA sequences. *Springer Semin Immunopathol* 22 (1-2), 1 - 9

Wagner H (1999): Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol* 73, 329 - 368

Walter S, Letiembre M, Liu Y, Heine H, Penke B, Hao W, Bode B, Manietta N, Walter J, Schulz-Schuffer W, Fassbender K (2007): Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem* 20, 947 - 956

Watson DA, Musher DM (1990): Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infect Immun* 58, 3135 - 3138

Watson DA, Musher DM, Verhoef J (1995): Pneumococcal virulence factors and host immune response to them. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14(6), 479 - 490

Winter AJ, Comis SD, Osborne MP, Tarlow MJ, Stephen J, Andrew PW, Hill J, Mitchell TJ (1997): A role for pneumolysin but not neuraminidase in the hearing loss and cochlear damage induced by experimental pneumococcal meningitis in guinea pigs. *Infect Immun.* 65, 4411 - 4418

Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, Smith SC, Boussof S, Segal DM, Duff GW, Dower SK (2000): Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol* 165(12), 7125 - 7132

Wyss-Coray T, Mucke L (2002): Inflammation in neurodegenerative disease - A double-edged sword. *Neuron* 35, 419 - 432

Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, Tong L (2000): Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 408(6808), 111 - 115

Yang H, Young DW, Gusovsky F, Chow JC (2000): Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. *J Biol Chem* 275(27), 20861 - 20866

Yu D, Kandimalla ER, Bhagat L, Tang JY, Cong Y, Tang J Agrawal S (2002): 'Immunomers'- novel 3'-3'-linked CpG oligodeoxyribonucleotides as potent immunomodulatory agents. *Nucleic Acids Res* 20, 4460 - 4469

## 8. Abkürzungsverzeichnis

|                    |  |
|--------------------|--|
| A:                 | Adenin   |
| A $\beta$ 1-42:    | <b>Amyloid-Beta - Peptid 1-42</b>                            |
| AICD:              | Aktivierungsinduzierter Zelltod                              |
| AP-1:              | Aktivator - Protein-1Beta 1                                  |
| C:                 | Celsius  |
| C:                 | <b>Cytosin</b>   |
| CD:                | Differenzierungsgruppe ( <i>Cluster of differentiation</i> ) |
| CDC:               | Cholesterol - abhängige Zytolysine                           |
| cm:                | Zentimeter   |
| cm <sup>2</sup> :  | Quadratcentimeter  |
| <b>CpG:</b>        | <b>Cytosin - Phosphat - Guanin</b>                           |
| CpG-ODN:           | CpG - <b>Oligonukleotide</b>                                 |
| Da:                | Dalton   |
| DMEM:              | Dulbecco's Minimales Essentielles Medium                     |
| DNA:               | Desoxyribonukleinsäure                                       |
| EC <sub>50</sub> : | <b>Mittlere effektive Konzentration</b>                      |
| ELISA:             | <b>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</b>                     |
| ER:                | Endoplasmatisches Retikulum                                  |
| ERK:               | Extrazelluläre signalregulierte Kinase                       |
| et al.:            | <b>und andere (<i>et alii</i>)</b>                           |
| FC:                | Kristallines Fragment ( <i>fragment crystalline</i> )        |
| FCS:               | Fetales Kälber-Serum ( <i>Fetal Calf Serum</i> )             |
| FMLP:              | <b>N-Formylmethionyl - Lencyl - Phenylalanin</b>             |
| g:                 | Erdbeschleunigung  |
| G:                 | Guanin   |
| GARG:              | <i>glucocorticoid attenuated response genes</i>              |
| GBS-F:             | <b>Gruppe-B - Streptokokken - Faktor</b>                     |
| Gram:              | Färbemethode, benannt nach <b>Hans Christian Gram</b>        |
| HKAL:              | <i>Heat-killed Acholeplasma laidlawii</i>                    |
| IFN:               | Interferon   |
| IgG:               | Immunglobulin G  |

|                       |   |
|-----------------------|---|
| IκB:                  | Inhibitorisches kappa-B-Protein               |
| IKK                   | Inhibitorische kappa-B-Kinase                 |
| IL:                   | Interleukin                                   |
| i-NOS:                | induzierbare Stickstoffmonoxid - Synthase     |
| IP:                   | <b>Interferon-gamma - induziertes Protein</b> |
| IRAK:                 | IL-1R-assozierte Kinase                       |
| IRF-3:                | Interferon-regulierender Faktor               |
| IRG1:                 | <i>immune responsive gene 1</i>               |
| JNK:                  | c-Jun NH2-terminale Kinase,                   |
| k:                    | Kilo  |
| l:                    | Liter   |
| LBP:                  | LPS - Bindungsprotein                         |
| log:                  | Logarithmus                                   |
| LPS:                  | Lipopolysaccharid                             |
| LRM:                  | Leukinreiches Motiv                           |
| m:                    | Milli   |
| M:                    | Mol, molar                                    |
| μ:                    | Mikro   |
| MAP:                  | Mitogenaktiviertes Protein                    |
| MHC:                  | <i>Major Histocompatibility Complex</i>       |
| mRNA:                 | <i>messenger-RNA</i>                          |
| MyD88:                | Myeloid - Differenzierungsfaktor-88           |
| n:                    | Nano  |
| n:                    | Anzahl  |
| Nf-κB:                | Nukleärer Faktor-kappa B                      |
| OH:                   | Hydroxid                                      |
| p:                    | <b>Signifikanzwert (<i>probability</i>)</b>   |
| p:                    | Pico  |
| p:                    | Protein                                       |
| Pam <sub>3</sub> Cys: | Tripalmitol-S-glycerilcysteinyl               |
| PBS:                  | Phosphat - gepufferte - Salzlösung            |
| PS:                   | Penicillin - Streptomycin                     |
| RNA:                  | Ribonukleinsäure                              |
| T:                    | <b>Thymidin</b>                               |

|            |  |
|------------|--|
| TAB:       | TAK1-bindendes Protein   |
| TAK1:      | <b>TGF-beta-aktivierende Kinase</b>  |
| TH1 / TH2: | Phänotyp einer T-Helfer-Zelle (1 oder 2)   |
| TIR:       | Toll - Interagierender Rezeptor  |
| TLR:       | <i>Toll-like</i> - Rezeptor  |
| TNF:       | Tumornekrosefaktor   |
| TRAF:      | Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor                                 |
| TRAM:      | <i>TRIF-related adapter Molekül</i>  |
| TRIF:      | <b><i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i></b> |
| WST:       | Wasserlösliches Tetrazolium  |
| z.B.:      | zum Beispiel   |
| ZNS:       | Zentrales Nervensystem   |
| °:         | Grad   |