

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Alle mehrzelligen Organismen weisen Abwehrmechanismen zum Schutz vor eindringenden Pathogenen auf, die diese zerstören und ihre Virulenzfaktoren neutralisieren. Pflanzen, Insekten und Säugetiere produzieren antimikrobielle Peptide gegen Bakterien, Pilze und mit lipidhaltigen Hüllen ummantelte Viren [1]. Diese phylogenetisch alte Form der Immunabwehr, als angeborene Immunität bezeichnet, beruht auf keimbahncodierten Rezeptoren, die häufig vorkommende Merkmale von mikrobiellen Pathogenen erkennen [2]. Vertebraten haben im Laufe der Evolution zusätzlich zu den Komponenten der angeborenen Immunität eine antigenspezifische Form der Immunabwehr entwickelt: das sogenannte adaptive Immunsystem [1].

1.1.1 Die angeborene Immunität

Die angeborene Immunität setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen. Hierzu gehören phagozytierende Zellen, die Körperoberflächen bedeckenden Epithelien, von aktivierten Phagozyten sezernierte Cytokine und Chemokine sowie Faktoren des Komplementsystems.

Durch Epithelien wie der Haut und den Schleimhäuten im Respirations- und Gastrointestinaltrakt schützt sich unser Körper gegenüber Krankheitserregern. Neben der physikalischen Barrierefunktion der Epithelzellen tragen weitere Mechanismen wie ein saurer pH-Wert im Magen, die Sezernierung antibakterieller Enzyme wie Lysozym in der Tränenflüssigkeit oder die Produktion antibakterieller Peptide wie α - und β -Defensine zur Abwehr gegen eindringende Krankheitserreger bei [3]. Überwindet ein potentiell pathogener Mikroorganismus diese Barrieren, wird er innerhalb von Minuten durch Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems bekämpft: Phagozyten wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten erkennen Pathogene anhand von charakteristischen Strukturmotiven, die diese von körpereigenen Zellen unterscheiden. Diese Struktur motive, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*), sind essentiell für das Überleben der Pathogene und deshalb im Verlauf der Evolution hoch konserviert [3-5]. Aus diesem Grund ist es dem System der angeborenen Immunität möglich, mit einer limitierten Anzahl keimbahncodierter Rezeptoren eine Vielzahl von Pathogenen zu erkennen und abzuwehren [2]. Auf die Pathogen-assoziierten molekularen Muster wird im Abschnitt 1.3.2 der Einleitung noch genauer eingegangen.

Die Aktivierung der angeborenen Immunabwehr ist wichtige Voraussetzung für eine nachfolgende adaptive Immunantwort. Ein bedeutendes Verbindungsglied zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität stellen dendritische Zellen (*dendritic cells, DCs*) dar. Haben antigenpräsentierende Zellen wie DCs und Makrophagen eindringende Pathogene an ihren Strukturmerkmalen erkannt, produzieren sie

Zytokine und regulieren kostimulatorische Moleküle herauf, die zu einer Aktivierung von T-Zellen des adaptiven Immunsystems führen [5].

1.1.2 Die adaptive Immunität

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem verwendet das adaptive Immunsystem ein umfangreiches Repertoire an Rezeptoren, die von rekombinierenden Genen codiert werden. So kann eine große Vielfalt von Pathogenen antigenspezifisch erkannt werden. Es entstehen antigenspezifische Effektorzellen und Gedächtniszellen, die eine erneute Infektion mit dem selben Pathogen verhindern können [3]. Das adaptive Immunsystem, das in der Evolution erst nach der angeborenen Immunität entstanden ist, kommt nur bei Vertebraten vor [1]. Zum adaptiven Immunsystem gehören B- und T-Lymphozyten, die auf ihrer Oberfläche antigenspezifische Rezeptoren aufweisen. Die antigenspezifischen Rezeptoren von B- und T-Lymphozyten setzen sich aus einer variablen und einer konstanten Region zusammen. Die variablen Regionen werden von zwei bzw. drei Genabschnitten codiert (V-, J-, und D-Segment), die durch somatische DNA-Rekombination zusammengebaut werden. Jedes dieser Gensegmente liegt in mehrfacher Kopie vor. Die zufällige Zusammensetzung der Gensegment-Kopien zu einer variablen Region ermöglicht somit ein großes Rezeptorrepertoire und die Erkennung einer Vielzahl von Antigenen [3]. Bei B-Lymphozyten liegen die antigenspezifischen Rezeptoren als Immunglobuline auf der Oberfläche vor. Sie können im Extrazellulärraum vorliegende Antigene direkt erkennen. Im Gegensatz dazu erkennen T-Lymphozyten Antigene über den T-Zell-Rezeptor nur nach Prozessierung und Präsentation der Antigenpeptide im Komplex mit MHC-Molekülen (major histocompatibility complex). Lymphozyten, die das Zelloberflächenprotein CD4 tragen (T-Helferzellen), binden an das MHC-II-Molekül, während $CD8^+$ Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen) das MHC-I-Molekül erkennen. Antigenpräsentierende Zellen nehmen Antigene auf und präsentieren es antigenspezifischen T-Lymphozyten. Zusätzlich zum präsentierten Komplex aus Antigenpeptid und MHC-Molekül sind für die vollständige Aktivierung von T-Lymphozyten kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 notwendig. Dendritische Zellen, als Vertreter der antigenpräsentierenden Zellen, erkennen mikrobielle Pathogene anhand von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern über *Toll-like* Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Die Induktion der TLR-Signalkaskade bewirkt die Ausreifung der DCs und die Präsentation von Antigenpeptiden. Des Weiteren regulieren sie MHC-Klasse-II-Moleküle und die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und -86 herauf, die für die T-Zell-Aktivierung notwendig sind [6].

1.2 *Toll-like* Rezeptoren

Die Familie der humanen *Toll-like* Rezeptoren, die zur Gruppe der mustererkennenden Rezeptoren (PRRs) gehört, nimmt durch ihre immunstimulierenden und -modulierenden Eigenschaften eine zentrale Stellung in der angeborenen Immunantwort ein. Ihr Name leitet sich von ihrer strukturellen und

funktionellen Homologie zu dem bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* entdeckten Rezeptor *Toll* ab. Dieser Rezeptor wurde ursprünglich im Zusammenhang mit seiner Bedeutung für die dorso-ventrale Polarisation in deren Ontogenese beschrieben [7, 8]. Da der Rezeptor im zytoplasmatischen Anteil Sequenzhomologien zu dem in Säugetieren vorkommenden IL-1-Rezeptor (IL-1R) aufweist, über den die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der Nukleärer Faktor κ B (NF- κ B)-Familie induziert wird, wurde vermutet, dass der Rezeptor *Toll* zusätzlich in Vorgänge der angeborenen Immunantwort involviert ist [9]. In der Taufliege wird über den *Toll*-Signalweg die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren induziert, die ihrerseits Sequenzhomologien zur NF- κ B-Familie aufweisen [10]. Die Vermutung, dass *Toll* neben seiner Funktion in der Entwicklung der Taufliege eine Rolle in deren Immunabwehr einnimmt, wurde durch Untersuchungen an *Drosophila*-Stämmen, die Mutationen im *Toll*-Gen aufwiesen, bestätigt: Die Aktivierung des Rezeptors in adulten Fliegen induziert die Expression des antifungalen Peptids *Drosomycin*, während Mutationen dieser Signalkaskade in einer verminderten Resistenz gegenüber fungalen Infektionen resultieren [11].

Die homologe, zytoplasmatische Domäne der IL-1R-Familie und der Proteine der *Toll*-Familie, die sogenannte TIR Domäne (Toll/IL-1R Domäne), lässt sich in einer Vielzahl von Transmembranproteinen und cytoplasmatischen Proteinen nachweisen [12]. Proteine, die eine TIR Domäne aufweisen, sind in der Evolution hoch konserviert und kommen neben Insekten wie *Drosophila melanogaster* und Säugetieren auch bei Nematoden und Pflanzen vor. Ein Großteil von ihnen ist in Abwehrmechanismen ihrer Immunsysteme involviert [13, 14].

1.2.1 Humane *Toll-like* Rezeptoren

1997 gelang der Arbeitsgruppe um Medzhitov und Janeway die Entdeckung des ersten humanen *Toll*-Homologs, welches heute als *Toll-like* Rezeptor 4 bezeichnet wird [15]. Bei Säugetieren sind inzwischen 11 Mitglieder der Familie der *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) identifiziert und für einige von ihnen Liganden beschrieben (Tabelle 1). Ein Großteil der Liganden gehört zu den Pathogen-assoziierten molekularen Mustern, andere sind endogene Liganden. Anhand ihrer Aminosäuresequenz können die Mitglieder der humanen *Toll-like* Familie in fünf Subfamilien unterteilt werden: die TLR2-, TLR3-, TLR4-, TLR5- und TLR9-Subfamilie. Die *Toll-like* Rezeptoren TLR1, TLR2, TLR6 und TLR10 gehören zur TLR2-Subfamilie. Die TLR9-Subfamilie setzt sich aus TLR7, TLR8 und TLR9 zusammen [16, 17].

Tabelle 1: Toll-like Rezeptoren und einige ihrer Liganden [5, 17-19]

Toll-like Rezeptor	Ligand	Herkunft
TLR2	LTA	gram-positive Bakterien
	PGN	gram-positive Bakterien
	Lipoproteine/-peptide	Bakterien
TLR2/TLR1	Tri-Acyl Lipopeptide	Bakterien
TLR2/TLR6	Di-Acyl Lipopeptide	Mykoplasmen
	Tri-Acyl Lipopeptide	Bakterien
TLR2/Dectin-1	Zymosan	Hefepilze
TLR3	doppelsträngige RNA	Viren
TLR4	LTA	gram-negative Bakterien
	Heat Shock Protein (HSP) 60	Wirtsorganismus (endogen)
TLR4/CD14/MD-2	LPS	gram-negative Bakterien
TLR5	Flagellin	Bakterien mit Geißeln
TLR7	Imidazoquinolin (Imiquimod)	Chemikalien
	einzelsträngige RNA	Viren
TLR8	einzelsträngige RNA	Viren
TLR9	nicht methylierte CpG DNA	Bakterien, Viren
TLR11	Profilin-ähnliche Moleküle	Toxoplasma gondii (Protozoen)
	uropathogene Bakterien	Bakterien

Toll-like Rezeptoren sind Transmembranproteine, die in ihrem zytoplasmatischen Anteil die bereits erwähnte TIR Domäne aufweisen, wohingegen sich die extrazelluläre Domäne durch eine Leucin-reiche Region (*leucine rich repeat*, LRR) auszeichnet [15]. Proteine, die eine LRR Domäne aufweisen, sind in verschiedenste biologisch wichtige Prozessen involviert. Eine Hauptfunktion scheint die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen zu sein wie die Erkennung und Bindung von Liganden und Signalübertragung [20]. Ein LRR aufweisendes Glykoprotein ist zum Beispiel der frei im Plasma oder auf der Oberfläche von myelomonozytischen Zellen vorkommende LPS-Rezeptor CD14, der gemeinsam mit TLR 4 eine zentrale Rolle in der Erkennung von Lipopolysacchariden gram-negativer Bakterien spielt [21].

Das Expressionsmuster der einzelnen Mitglieder der *Toll-like* Rezeptoren variiert zwischen den verschiedenen Immunzellen. Einige Subpopulationen wie Monozyten scheinen alle TLRs (TLR1 - 10) zu exprimieren, während andere Zelltypen nur bestimmte TLRs exprimieren [22, 23]. So exprimieren myeloide dendritische Zellen (*myeloid dendritic cells*, mDCs) des humanen Bluts TLR1, -2, -3, -4, -5, -7 und -8, während plasmazytoide dendritische Zellen (*plasmacytoid DCs*, pDCs) nur die *Toll-like* Rezeptoren 7 und -9 exprimieren [24]. Darüber hinaus unterscheidet sich auch das Expressionsniveau der

einzelnen *Toll-like* Rezeptoren in den verschiedenen Immunzellen: Monozyten exprimieren, verglichen mit B-Lymphozyten, CD4⁺- bzw. CD8⁺-Lymphozyten und NK-Zellen, die höchsten Level an TLR2 und -4, während B-Lymphozyten und pDCs eine ausgeprägte TLR9-Expression aufweisen [23]. Die Oberflächenexpression der *Toll-like* Rezeptoren scheint, verglichen mit anderen Oberflächenantigenen, verhältnismäßig gering zu sein [25]. Auch andere Zellen wie beispielsweise Keratinozyten, synoviale Fibroblasten, Endothelzellen, nasale Mukosazellen und intestinale Epithelzellen exprimieren *Toll-like* Rezeptoren [26-30].

1.3 Mustererkennende Rezeptoren und Pathogen-assoziierte molekulare Muster

Toll-like Rezeptoren gehören zur Gruppe der mustererkennenden Rezeptoren (PRRs). Diese nehmen in den Abwehrprozessen der angeborenen Immunabwehr eine zentrale Stellung ein, da sie sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) erkennen.

1.3.1 Mustererkennende Rezeptoren

Mustererkennende Rezeptoren (PRRs) werden sowohl intrazellulär als auch auf der Oberfläche verschiedener Zellen exprimiert oder werden in Blut oder Gewebsflüssigkeiten sezerniert. Neutrophile und eosinophile Granulozyten, natürliche Killerzellen und antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen weisen PRRs auf. Sie dienen der Opsonierung, der Aktivierung der Komplement- oder Gerinnungskaskade, der Aktivierung pro-inflammatorischer Signalwege oder der Induktion von Apoptose.

Zur Gruppe der sezernierten PRRs gehören unter anderem die in der Leber gebildeten Akute-Phase Proteine C-reaktives Protein (CRP) und das LPS-bindende Protein (*LPS-binding protein*, LBP). LBP ist in die Erkennung bakterieller Lipopolysaccharide involviert, indem es mit LPS einen Komplex bildet, der anschließend zum LPS-Rezeptorprotein CD14 transferiert wird [31-33].

CD14, ein Glykoprotein, gehört zur Gruppe der auf Zelloberflächen vorkommenden PRRs und wird auf myelomonozytischen Zellen exprimiert, wo es, über einen Phosphoinosit-Glykolipid-Schwanz an die Zelloberfläche gebunden, vorliegt. In CD14-negativen Zellen, wie z.B. Endothelzellen, ersetzt frei im Plasma vorkommendes, lösliches CD14 (*soluble* CD14, sCD) die membrangebundene Form, so dass diese ebenfalls auf LPS reagieren können [5].

Ein Beispiel für die Gruppe der intrazellulären PRRs sind die NOD-Proteine (*nucleotide-binding oligomerization domain*, NOD). Diese sind an der intrazellulären Erkennung mikrobieller Pathogene und ihrer Produkte beteiligt. Zwei Mitglieder dieser Familie, die NOD-Proteine NOD1 und -2, erkennen Bestandteile des Peptidoglykans (PGN) in der Zellwand von Bakterien und induzieren die Aktivierung von NF- κ B. Es konnte eine Assoziation zwischen Polymorphismen im NOD2-Gen mit Morbus Crohn, einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung, gezeigt werden [34].

1.3.2 Pathogen-assoziierte molekulare Muster

Die Pathogen-assoziierten molekularen Muster sind in der Evolution hoch konservierte Struktur motive mit deren Hilfe Zellen des angeborenen Immunsystems ein eindringendes Pathogen und somit eine drohende Infektion des Wirts erkennen und Abwehrmechanismen aktivieren können. Da Mutationen oder Verlust dieser Strukturen eine mögliche Gefährdung des Überlebens des Mikroorganismus darstellen, sind sie einer geringen Mutationsrate unterlegen. Diese Struktur motive werden nicht von den Zellen des Wirts gebildet, so dass darüber eine Unterscheidung in körpereigen und körperfremd möglich ist. PAMPs einer bestimmten Gruppe von Mikroorganismen sind identisch. So weisen alle gram-negativen Bakterien in ihrer äußeren Zellwand Lipopolysaccharide (LPS) auf und werden anhand des für die biologische Aktivität verantwortlichen Lipid A- Anteils erkannt. Daher ist es dem System der angeborenen Immunität möglich, mit einer limitierten Anzahl keimbahncodierter Rezeptoren eine Vielzahl von Pathogen zu erkennen und abzuwehren [2]. Mustererkennende Rezeptoren können jedoch nicht erkennen, ob es sich um potentiell pathogene oder symbiontische Mikroorganismen handelt. Die genauen Mechanismen, die ermöglichen, dass ein Wirtsorganismus nicht-pathogene Mikroorganismen toleriert, sind bisher noch nicht geklärt [35].

Zu den PAMPs gehört eine Vielzahl unterschiedlicher Struktur motive. Im Folgenden werden einige vorgestellt, die durch TLRs erkannt werden.

1.3.2.1 Lipopolysaccharide

Die Zellhülle gram-negativer Bakterien zeigt einen mehrschichtigen Aufbau. Neben einer dünnen Mureinschicht weisen sie eine äußere Membran auf, in deren äußerer Lamellenhälfte Lipopolysaccharide (LPS) als integraler Bestandteil vorkommen. LPS sind komplexe Glykolipide aus drei strukturellen Anteilen, wovon das Lipid A den biologisch aktiven Anteil darstellt und die Verankerung in der Membran gewährleistet. LPS werden auch als Endotoxine bezeichnet. Werden Makrophagen mit LPS stimuliert, produzieren sie Zytokine wie z.B. TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-10. Frei im Blut vorkommendes LPS wird sofort vom LPS-bindenden Protein (LBP) gebunden und zum Oberflächenrezeptor CD14 oder dessen löslicher Form (sCD14) transferiert. TLR4 und das sezernierte, an die extrazelluläre Domäne von TLR4 gebundene Protein MD-2 binden den LPS/LBP/CD14-Komplex. CD14 und MD-2 weisen keine transmembranären Domänen auf, so dass die Signaltransduktion erst über den kompletten Komplex mit TLR4 erfolgt [5, 32, 36].

1.3.2.2 Peptidoglykan

Die Zellhülle gram-positiver und -negativer Bakterien enthält als einen wesentlichen Bestandteil Peptidoglykan (PGN) bzw. Murein. Gram-positive Bakterien weisen eine mehrschichtige

Peptidoglykanschicht, gram-negative Bakterien nur eine einschichtige Mureinschicht zwischen der Zellmembran und der äußeren Membran auf. Das Peptidoglykan der Bakterienzellwand ist aus Zuckerketten aufgebaut, die alternierend N-actylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure enthalten. Diese Zuckerketten sind miteinander durch Oligopeptide quervernetzt. Das so entstehende Netzwerk ist wesentlich für die Form und die mechanische Stabilität der Bakterienzelle verantwortlich. Neben der Dicke der Peptidoglykanschicht unterscheiden sich gram-positive und negative Bakterien auch in ihren vernetzenden Oligopeptiden. So weist das PGN gram-negativer Bakterien Muramyltripeptide auf und gram-negative und -positive Bakterien Muramyldipeptide (MDP). Die Stimulation mit Peptidoglykan induziert in Makrophagen, vermittelt über die *Toll-like* Rezeptoren 2 und -6, die Produktion von TNF- α [5, 36, 37].

1.3.2.3 Lipoteichonsäuren

Lipoteichonsäuren (LTA) kommen in der Zellwand gram-positiver Bakterien vor. Sie sind, wie auch LPS, amphiphil, das heißt, sie weisen sowohl einen hydrophoben als auch einen hydrophilen Anteil auf. Der hydrophile Anteil, ein Polyphosphatpolymer, ist über ein Glykolipid an der äußeren Zytoplasmamembran verankert. Die chemische Struktur der LTA variiert zwischen verschiedenen gram-positiven Bakterien. Die am weitesten verbreitete LTA-Struktur, wie sie bei *Staphylococcus aureus* zu finden ist, besteht aus einem linearen Polymer aus Polyglycerolphosphat-Einheiten, die über eine Phosphodiesterbindung verbunden sind. Bakterien, die diesen klassischen LTA-Typ aufweisen, unterscheiden sich in der Häufigkeit, in der D-Alanin oder D-Alanin mit einem Glykosylrest an diese Kette substituiert sind. Je lipophiler diese Kette ist, desto höher scheint die biologische Aktivität zu sein. So induziert LTA von *Staphylococcus aureus* (hoher Alaningehalt) eine stärkere Stickstoffmonoxid-Freisetzung in Makrophagen als LTA von *Bacillus subtilis*, einem anderen gram-positiven Bakterium. Pneumokokken weisen eine vom klassischen LTA-Typ abweichende Struktur auf. Werden humane Monozyten mit LTA stimuliert, werden pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α freigesetzt. Bei gleichzeitiger Stimulation mit LTA und Muramyldipeptiden (MDP), die als vernetzende Peptide in allen PGN vorkommen, kann eine gesteigerte Zytokinfreisetzung beobachtet werden, was ein Zusammenwirken der beiden PAMPs vermuten lässt. Die Aktivierung von Immunzellen durch LTA erfolgt über TLR2 und wird durch CD14 und LBP verstärkt, die eine zentrale Rolle in der LPS-Erkennung spielen [38, 39].

1.3.2.4 Lipoproteine/Lipopeptide

Lipoproteine/Lipopeptide sind oberflächenassoziierte Proteine der bakteriellen Zellwand, die in einer Vielzahl von Bakterien vorkommen. Sie induzieren starke Entzündungsreaktionen, wobei die pro-inflammatorischen Eigenschaften auf ihre N-terminalen Cystein-Einheiten zurückzuführen sind. Man unterscheidet zwischen tri- und diacylierten Lipopeptiden (Pam₃Cys oder Pam₂Cys). Die Erkennung von

diacylierten Lipopeptiden erfolgt über das TLR2/TLR6-Heterodimer, wohingegen die Erkennung von triacylierten Lipopeptiden vorwiegend über TLR2/TLR1-Heterodimere vermittelt wird. Neuere Studien zeigen, dass TLR6 ebenfalls als Ko-Rezeptor von TLR2 bei der Erkennung von triacylierten Lipopeptiden fungieren kann. Darüber hinaus scheint die Aktivierung von Immunzellen durch Lipopeptide, ebenso wie durch LTA, durch CD14 und LBP verstärkt zu werden [40, 41].

1.3.2.5 Mikrobielle DNA, nicht methylierte CpG-Motive

Aufgrund struktureller Unterschiede im Aufbau der DNA von Wirbeltieren und Bakterien bzw. Viren kann das Immunsystem potentielle Krankheitserreger anhand ihrer DNA-Strukturen erkennen. Im Vergleich zur DNA von Wirbeltieren weist die DNA von Bakterien einen deutlich höheren Anteil an Cytosin-Guanosin-Dinukleotiden (CpG) auf. Des Weiteren weisen die CpG-Motive von bakterieller bzw. viraler DNA keine Methylgruppe am Cytosin auf. Diese nicht methylierten CpG-Motive, aber auch synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die nicht methylierte CpG-Dinukleotide enthalten (*synthetic oligodeoxynucleotides*, ODNs), weisen im Vergleich zu methylierten CpG-Motiven immunstimulatorische Aktivität auf. So stimulieren sie die Proliferation und Zytokinfreisetzung von B-Lymphozyten. Des Weiteren aktivieren sie Makrophagen und dendritische Zellen zur Sekretion von Zytokinen und induzieren eine Zunahme der Expression kostimulatorischer Moleküle. Die Aktivierung von intrazellulären Signaltransduktionskaskaden nach Interaktion mit nicht methylierten CpG-Motiven wird über *Toll-like* Rezeptor 9 vermittelt [42].

1.4 *Toll-like* Rezeptoren als mustererkennende Rezeptoren

Lange war man davon ausgegangen, dass das angeborene Immunsystem trotz zellulärer (z.B. Monozyten, Neutrophile Granulozyten) und humoraler Komponenten (z.B. Komplementsystem) nur sehr unspezifisch auf eindringende Pathogene reagieren kann. *Toll-like* Rezeptoren, die eine wichtige Gruppe der PRRs darstellen, scheinen der angeborenen Immunität jedoch einen gewissen Grad an Spezifität zu verleihen. Es konnten spezifische intrazelluläre Signalwege für verschiedene TLRs nachgewiesen werden, die auf bestimmte PAMPs hin zur Freisetzung charakteristischer Zytokinprofile führen (MyD88-abhängiger und -unabhängiger Signalweg). Des Weiteren kann der gleiche Ligand über den gleichen *Toll-like* Rezeptor bei verschiedenen Zelltypen die Produktion unterschiedlicher Zytokine induzieren (Imiquimod induziert über TLR7 bei mDCs die Freisetzung von IL-12, bei pDCs von IFN- α). Ferner bilden TLRs Rezeptorkomplexe mit anderen TLRs (z.B. TLR2/TLR1, TLR2/TLR6) oder anderen Molekülen (z.B. TLR4/CD14/MD-2, TLR2/CD14, Dectin-1/TLR2/TLR6), wodurch eine weitere Spezifizierung erreicht wird. So erkennt das TLR1/TLR2-Heterodimer tri-acylierte Lipopeptide, TLR2/TLR6 dagegen vorwiegend di-acylierte Lipopeptide. Der TLR4/CD14/MD2-Rezeptorkomplex ist essentiell für die Erkennung von LPS. Der in die LPS-Signalkaskade involvierte Rezeptor CD14 kooperiert weiterhin mit

TLR2 bzw. TLR2/TLR1-Komplexen bei der Erkennung von Lipoproteinen und -peptiden sowie bei der Immunzellaktivierung durch LTA. TLR2, TLR6 und Dectin-1, ebenfalls ein PRR, wirken zusammen bei der Erkennung von Zymosan, einem Zellwandbestandteil von Hefezellen [5, 39, 40, 43-45].

Einige Mitglieder der TLR-Familie erkennen auch endogene Liganden, wie zum Beispiel Fibrinogen, Fibronectin oder HSP60 (*heat shock protein*), die typischerweise während Entzündungsreaktionen produziert oder von zerstörten Zellen freigesetzt werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass TLRs möglicherweise regulierend in entzündliche, nicht-infektiöse Prozesse eingreifen [17].

1.4.1 Informationsübertragung über die Toll-like Rezeptoren-Signalkaskade

Wie im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, können über TLRs spezifische intrazelluläre Signalwege induziert werden, so dass charakteristische Zytokinprofile freigesetzt werden. Generell kann man in der TLR-Signalkaskade einen MyD88-abhängigen Weg, den alle TLR-Mitglieder außer TLR3 nutzen, und einen MyD88-unabhängigen Weg, über den nur einige TLRs Signale vermitteln, unterscheiden. Anhand der Toll-like Rezeptoren 2, -3, -4 und -9 sollen die intrazellulären Signalwege im Folgenden exemplarisch dargestellt werden (Abbildung 1).

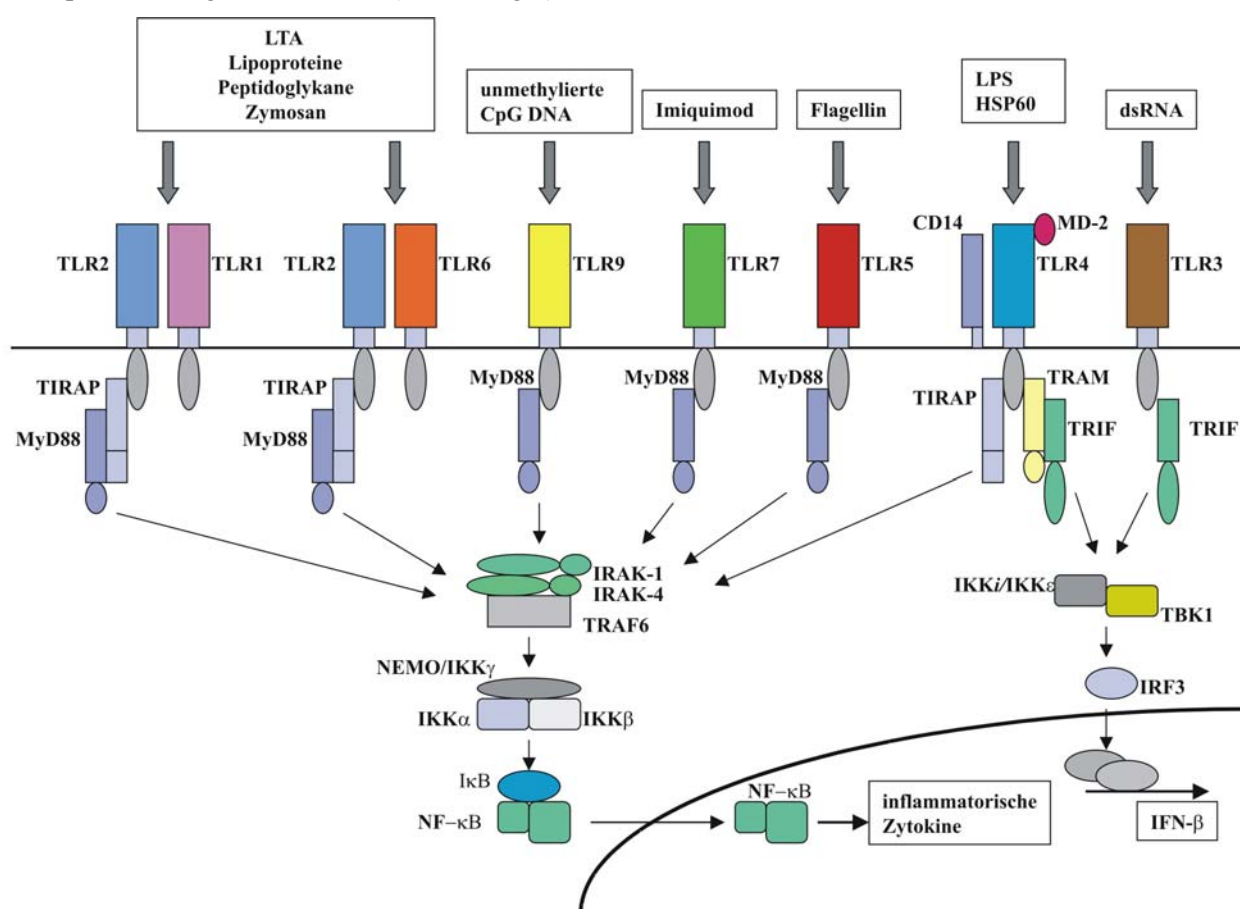


Abbildung 1: Die Toll-like Rezeptoren-Signalkaskade

Modifiziert nach Takeda K, Akira S; Journal of Dermatological Science (2004) 34, 73-82

1.4.1.1 Der MyD88-abhängige Signalweg

Nicht methylierte CpG-Motive aktivieren über TLR9 die intrazytoplasmatische Signalkaskade.

Das Adapterprotein MyD88 tritt infolge von Interaktionen zwischen TLRs und PAMPs über seine C-terminale TIR-Domäne mit der TIR-Domäne des TLR in Wechselwirkung. Über seine N-terminale „Todesdomäne“ (zuerst bei Proteinen gefunden, die in Apoptoseprozesse involviert sind) bindet und aktiviert MyD88 die IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK) 4, was zur Phosphorylierung von IRAK1 führt. IRAK1 und -4 bilden nachfolgend einen Komplex mit TRAF6 (Tumor Nekrose Faktor Rezeptor assoziierter Faktor 6). Dieser Komplex aktiviert den IκB (*inhibitory κB*)-Kinase-Komplex (IKK) oder mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinasen (MAPKK). IκB hält NF-κB im Zytoplasma zurück, bis es durch den IKK-Komplex, bestehend aus IKKα und -β sowie NEMO/IKKγ, phosphoryliert wird. NF-κB kann nun in den Zellkern einwandern und die Transkription von Genen inflammatorischer Zytokine induzieren. MAPKK führen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Adapterprotein-1 (AP-1) über die c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK). Diesen MyD88-abhängigen Signalweg weisen alle TLR-Mitglieder bis auf TLR3, wenn auch in leicht modifizierter Form, auf.

1.4.1.2 Der MyD88-abhängige Signalweg/ TIRAP

Erkennt TLR2 ein eindringendes, potentiell pathogenes Bakterium beispielsweise anhand von Peptidoglykanen in dessen Zellhülle, wird die TLR-Signalkaskade über den eben dargestellten MyD88-abhängigen Weg aktiviert. Im Unterschied zu anderen TLRs wie TLR5, -7 und -9 ist in den MyD88-abhängigen Signaltransduktionsweg der *Toll-like* Rezeptoren 2 und -4 ein weiteres essentielles Molekül, das TIR-Domäne-enhaltende Adapterprotein (TIRAP) involviert.

1.4.1.3 Der MyD88-unabhängige Signalweg/ TRIF

Die intrazelluläre Signalübertragung nach Stimulation mit viraler dsRNA über TLR3 scheint vollständig unabhängig von MyD88 zu sein. Daten, die eine Aktivierung von NF-κB nach Stimulation von MyD88-defizienten Makrophagen mit dsRNA (via TLR3) bzw. LPS (via TLR4) nachweisen konnten, bestätigten die Existenz eines MyD88-unabhängigen Signalwegs. Nach LPS- bzw. dsRNA-Stimulation werden über den unabhängigen Signalweg der Transkriptionsfaktor IRF-3 aktiviert, IFN-β und die Expression zahlreicher IFN-abhängiger Gene induziert, was für die Abwehr viraler Pathogene relevant ist. Essentiell für diesen Signalweg ist das TIR-Domäne-enhaltende IFN-β-induzierende Adaptermolekül (TRIF). Im Gegensatz zum MyD88-abhängigen Weg sind im unabhängigen Weg andere IκB-Kinasen (IKKi/IKKe und TBK1) involviert.

1.4.1.4 Der MyD88-unabhängige Signalweg/ TRIF/ TRAM

Die Zellantwort auf LPS über TLR4 kann sowohl über den MyD88-abhängigen als auch über einen MyD88-unabhängigen Weg vermittelt werden. Vor kurzem wurde ein weiteres eine TIR-Domäne aufweisendes Molekül entdeckt: TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*). TRAM spielt im TLR4 vermittelten, MyD88-unabhängigen Signalweg eine Rolle, während es in den TLR3-vermittelten, MyD88-unabhängigen Signalweg nicht involviert zu sein scheint [17, 46, 47].

1.4.2 Toll-like Rezeptoren: immunmodulierende Verbindungsglieder zwischen angeborener und adaptiver Immunität

Nach Präsentation von Antigenpeptiden in Kombination mit MHC- und costimulatorischen Molekülen durch antigenpräsentierende Zellen können naive T-Helferzellen in zwei verschiedene Subtypen, Th1 und Th2-Lymphozyten, differenzieren. Th1-Zellen sezernieren IFN- γ , IL-2 und TNF- β , während Th2-Zellen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzieren. Th1-Zellen fördern vor allem eine zelluläre Immunantwort, indem sie Makrophagen und zytotoxische T-Lymphozyten aktivieren, während Th2-Zellen eine humorale Immunantwort, also die Bildung von Antikörpern, induzieren. Von Th2-Zellen sezernierte Zytokine bewirken einen Isotypenwechsel von IgM zu IgE oder zu IgG₂ und IgG₄. Eine Immunantwort vom Th2-Typ mit der Produktion von IgE durch B-Lymphozyten ist charakteristisch bei der Immunabwehr von Infektionen mit Parasiten wie auch bei atopischen Erkrankungen. Die von den CD4⁺-Subtypen sezernierten Zytokine blockieren jeweils die Aktivierung des anderen T-Helferzelltyps. So verhindert von Th2-Zellen sezerniertes IL-10 die Entwicklung von Th1-Zellen und IFN- γ , als Th1-Zytokin, die Aktivierung von Th2-Zellen. Entscheidend für die Differenzierung in Th1 oder Th2-Zellen ist das vorliegende Zytokinmilieu. So lenkt IL-12 die Differenzierung in Richtung Th1, wohingegen IL-4 eine Differenzierung in Th2-Zellen induziert. Ob T-Helferzellen in Th1 oder Th2-Zellen differenzieren, hängt überdies von der Menge des Antigenpeptids und der Stärke, mit der es an den T-Zellrezeptor bindet, ab. Dies spielt möglicherweise bei der Entwicklung von Allergien eine Rolle, wo Allergene, die im Allgemeinen in niedrigen Konzentrationen vorkommen, durch eine schwache Bindung an den T-Zellrezeptor eine Th2-Antwort hervorrufen (vgl. Abschnitt 1.6.) [3, 46].

Die Aktivierung der *Toll-like* Rezeptor-Signalkaskade induziert in antigenpräsentierenden Zellen vor allem die Produktion von Zytokinen, auf die eine Immunantwort vom Th1-Typ folgt. So generieren beispielsweise nicht methylierte CpG-Motive in Natürlichen Killerzellen, Monozyten und Makrophagen die Produktion von IL-12 und IFN- γ [48]. Nach Aktivierung der TLR-Signalkaskade über TLR7 sezernieren pDCs IFN- α und mDCs IL-12, was in beiden Fällen die Differenzierung zu IFN- γ -produzierenden Th1-Lymphozyten aus unreiferen Vorstufen induziert (Abbildung 2) [43].

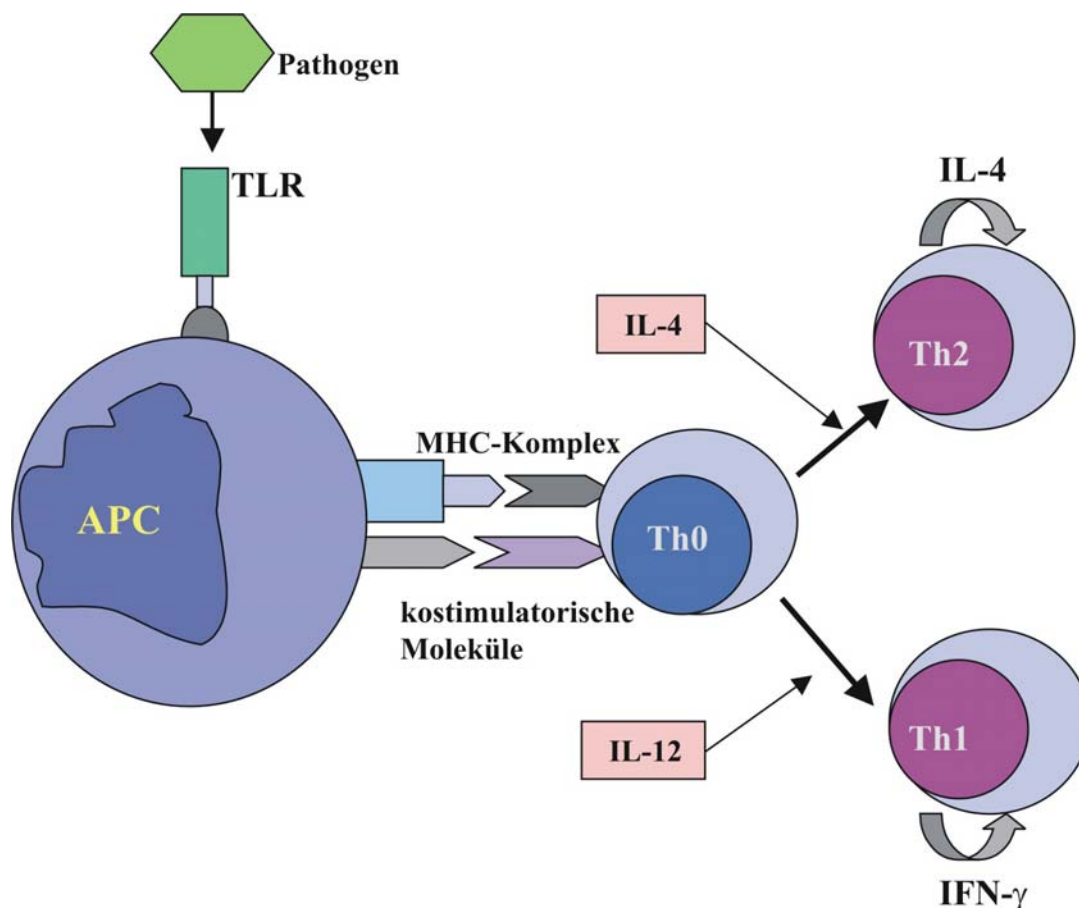


Abbildung 2: Aktivierung der *Toll-like*-Rezeptor-vermittelten Signalkaskade

1.4.3 Regulation der TLR-Expression

Viele Studien haben gezeigt, dass die Stimulation von Immunzellen mit PAMPs eine Veränderung im Expressionsniveau der *Toll-like* Rezeptoren induziert. So regulieren zum Beispiel humane B-Lymphozyten und pDCs nach Stimulation mit synthetischen Oligonukleotiden (nicht methylierte CpG-Motiven) TLR9 herunter und humane Mukosazellen TLR4 nach LPS-Stimulation herauf [23, 29]. Aber nicht nur potentielle Liganden verändern die Expressionslevel, sondern auch Zytokine, die von Zellen des Immunsystems im Laufe von Abwehrprozessen ausgeschüttet werden. IL-2 ist ein von Th1-Zellen produziertes Zytokin, das die Proliferation und Differenzierung von naiven T-Zellen zu Effektorzellen

auslöst [3]. Stimulation mit IL-2 führt zu einem Anstieg der TLR2- und TLR4-Expression [49, 50]. IL-4, ein wichtiges Effektormolekül, das von Th2-Lymphozyten ausgeschüttet wird, aber auch deren Entwicklung begünstigt, regt zusammen mit anderen Molekülen die Proliferation von B-Lymphozyten an und löst in ihnen den Isotypenwechsel zu IgE aus [3]. Durch Stimulation mit IL-4 regulieren humane Monozyten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene TLR2 und -4 herunter [50-52]. IFN- γ , von Th1-Zellen gebildet, verstärkt die Expression der MHC-I- und II-Moleküle und unterdrückt die Proliferation von Th2-Zellen [3]. IFN- γ induziert in Monozyten den Anstieg der Expression der *Toll-like* Rezeptoren 2 und 4 auf mRNA- und Proteinniveau [49, 53, 54]. TNF- α , das u.a. infolge von LPS-Stimulation ausgeschüttet wird, und IL-1 β , ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin, bewirken einen Anstieg der TLR2-Expression in Makrophagen [49].

1.5 Atopische Dermatitis

Die atopische Dermatitis (AD) ist eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung mit einer Lebenszeitprävalenz von 10 - 20% bei Kindern und 1 – 3% bei Erwachsenen [55]. Die Kosten zur Behandlung einer atopischen Dermatitis pro Patient sind hoch und variieren abhängig vom Schweregrad der Erkrankung und vom jeweiligen Gesundheitssystem [56]. Die atopische Dermatitis gehört wie die allergische Rhinokonjunktivitis und allergisches Asthma bronchiale zu den Erkrankungen des atopischen Formenkreises. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch ein juckendes Ekzem, das abhängig vom Alter der Betroffenen unterschiedliche Prädilektionsstellen aufweist. Während das Ekzem im Säuglingsalter vorwiegend an den Wangen, auf der Kopfhaut und am Rumpf auftritt, sind im Kindes- und Erwachsenenalter die großen Beugen, die Hals-, Nackenregion sowie Hand- und Fußrücken betroffen.

70 - 80% der AD-Patienten weisen erhöhte Plasma-IgE-Spiegel und eine Typ-I-Sensibilisierung gegenüber Umweltallergenen auf (extrinsische AD), während bei 20 - 30% der Patienten die Erkrankung durch niedrige IgE-Spiegel und eine fehlende Sensibilisierung (intrinsische AD) gekennzeichnet ist [57]. In den Verlauf der atopischen Dermatitis sind beide T-Helferzell-Populationen involviert. So lassen sich in äußerlich unbetreffener Haut und in akuten Läsionen von Patienten, die an AD leiden, vermehrt Th2-Lymphozyten mit einer gesteigerten Expression der Interleukine -4, -5 und -13 nachweisen. Chronische Hautläsionen zeichnen sich durch einen Anstieg an IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen aus, die eine Persistenz der Entzündungsreaktion bedingen. Es lassen sich jedoch auch weiterhin hohe Mengen an IL-5 und IL-13 nachweisen. IL-5 spielt eine zentrale Rolle in der Aktivierung eosinophiler Granulozyten, die nach Degranulierung Proteine freisetzen, die ihrerseits die Degranulierung von Mastzellen und basophilen Granulozyten fördern [55]. Die pathogenetischen Mechanismen, die zur Etablierung der Erkrankung beitragen, sind bis heute nicht vollständig geklärt. Es konnten jedoch bereits einige charakteristische Merkmale und Triggerfaktoren identifiziert werden. So kann z.B. bei über 90% der AD-Patienten aus akuten oder chronischen Hautläsionen das gram-positive Bakterium *Staphylococcus aureus* isoliert

werden. Die Produktion von IgE-Antikörpern gegen die von diesem Bakterium sezernierten Toxine korreliert mit dem Schweregrad der Hautläsionen [58]. Ein gesteigerter Juckreiz in Kombination mit kutaner Hyperreaktivität führt zu einem *Circulus vitiosus* aus mechanischer Stimulation durch Kratzen, Zerstörung der Hautbarriere, Eindringen von Bakterien und Dysregulation der Zytokinfreisetzung. So synthetisieren beispielsweise Keratinozyten in der Haut von AD-Patienten unter anderem verstärkt das proinflammatorische Zytokin TNF- α [59].

1.6 Hygienehypothese und atopische Erkrankungen

1989 postulierte Strachan erstmals, dass der zu beobachtende Anstieg Th2-vermittelter, allergischer Erkrankungen in industrialisierten Ländern möglicherweise aus dem Absinken von Infektionskrankheiten im Kindesalter zu erklären sei. In dieser als *Hygienehypothese* bekannten Theorie wurde dargelegt, dass verbesserte hygienische Standards, sinkende Familiengrößen und eine damit verbundene, sinkende Anzahl an Infektionen im Kindesalter potentielle Ursachen für die steigende Prävalenz allergischer Erkrankungen darstellen [60]. Eine gesteigerte Stimulation des Immunsystems mit mikrobiellen Produkten bzw. immunstimulierenden Strukturmotiven wie PAMPs könnte die Immunantwort in Th1-Richtung lenken und so möglicherweise einen präventiven Einfluss gegenüber der Entwicklung allergischer Erkrankungen haben. In diese Richtung deuten die Ergebnisse von Braun-Fahländer et al., die in einer großen Studie mit 812 Kindern aus ländlicher Umgebung eine Korrelation zwischen erhöhter Endotoxin-Exposition und einer verminderten Frequenz an Heuschnupfen und allergischem Asthma feststellen konnten [61].

Im Zusammenhang mit der Entwicklung von atopischen Erkrankungen steht ferner die Beobachtung, dass Stimuli des Immunsystems, wie mikrobielle Struktur motive, die Immunantwort dosisabhängig modulieren. Es konnte gezeigt werden, dass abhängig von der eingesetzten LPS-Konzentration die Immunantwort in eine Th1- oder eine Th2-Antwort mündet. Die Inhalation hoher LPS-Mengen bewirkt die Induktion einer Th1-Antwort mit charakteristischer Produktion an IFN- γ und IgG_{2a}. Dem entgegengesetzt induziert die Inhalation niedriger LPS-Level eine Immunantwort vom Th2-Typ mit einer Produktion der Interleukine-5 und -13, einer durch eosinophile Granulozyten-dominierten Atemwegsinfektion und einer gesteigerten Produktion der Immunglobuline IgE und IgG₁ [62]. Damit übereinstimmend zeigen Studien, dass die Exposition mit höheren Endotoxinmengen das Risiko senkt, in den ersten sechs Lebensmonaten eine atopische Dermatitis zu entwickeln, und mit einer signifikant erhöhten Produktion an IFN- γ durch T-Lymphozyten korreliert [63, 64].

1.7 Ansätze zur Prävention und Therapie bei Erkrankungen mit Th1/Th2-Dysbalance

Das immunmodulierende Potential der *Toll-like* Rezeptoren die Immunantwort in eine Th1-Antwort zu lenken, macht diese Rezeptorfamilie zu potentiellen Angriffspunkten möglicher Therapien bei

Erkrankungen mit Th1/Th2-Dysbalance sowie zum Ziel präventiver Maßnahmen. Bei Erkrankungen, die durch eine Immunantwort vom Th1-Typ dominiert sind, wie z.B. die rheumatoide Arthritis, könnte die Aktivierung der TLR-Signalkaskade deshalb möglicherweise von Nachteil sein. Studien konnten zeigen, dass eine Blockade von *Toll-like* Rezeptoren durch antagonistische Liganden das Entzündungsgeschehen tatsächlich mildert und mit einer Besserung des klinischen Bilds einhergeht [65]. Im Gegensatz dazu sind Erkrankungen des atopischen Formenkreises wie die allergische Rhinokonjunktivitis, allergisches Asthma bronchiale und die atopische Dermatitis durch eine in Th2-Richtung verschobene Immunantwort gekennzeichnet. Hierzu gibt es verschiedene Studien, die zeigen, dass die Stimulation der TLR-Signalkaskade eine klinische Verbesserung bewirkt bzw. präventiv gegenüber der Entwicklung allergischer Erkrankungen wirkt. Daten unserer Arbeitsgruppe konnten beispielsweise eine Abnahme der IgE-Produktion und einen Sekretionsanstieg der Th1-Zytokine IL-2 und IFN- γ nach Stimulation von humanen PBMC von AD-Patienten mit synthetischen Oligodesoxynukleotiden (CpG-ODN) nachweisen [66]. Eine finnische Studiengruppe konnte zeigen, dass die orale Gabe von Laktobazillus GG an schwangere Frauen und an ihre neugeborenen Kinder die Häufigkeit, eine AD zu entwickeln, bei den Kindern um die Hälfte reduziert. Als Probanden wurden in dieser Placebo-kontrollierten Studie Frauen mit einer positiven Familienanamnese bezüglich atopischer Dermatitis aufgenommen [67].