

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene, CHARITÉ,
Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ulf B. Göbel)

Mikrobielle Zellwandbestandteile und das angeborene Immunsystem:
Rezeptoren, Mediatoren und Genpolymorphismen

Habilitationsschrift

Zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach
Angewandte Molekularbiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät CHARITÉ,
Universitätsmedizin, Berlin

von

Dr. rer. nat. Lutz Hamann
geboren am 06.06.1960 in Hamburg

Vorstandsvorsitzender: Prof. Dr. Detlev Ganten

Dekan: Prof. Dr. Martin Paul

Eingereicht am:

Gutachter: 1.

2.

Inhaltsverzeichnis

I	Liste der Abkürzungen	III
1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.2	Das angeborene Immunsystem.....	2
1.3	"pathogen associated molecular patterns" (PAMPs).....	5
1.3.1	Lipopolysaccharid (LPS).....	7
1.4	"pattern recognition receptors" (PRRs).....	9
1.4.1	Membranständige PRRs	10
1.4.2	Sezernierte PRRs.....	11
1.4.3	Zytosolische PRRs	12
1.5	Polymorphismen in Genen des angeborenen Immunsystems	13
2	Zielsetzung und Ergebnisse der eigenen Arbeit.....	14
2.1	Identifizierung neuer PRRs des LPS-Rezeptorkomplexes.....	15
2.2	Funktionelle Charakterisierung des LPS-bindungs Protein	17
2.3	SNPs in PRR-Genen und inflammatorische Erkrankungen.....	19
2.3.1	Einfluss von TLR-SNPs auf Atherosklerose.....	19
2.3.2	Einfluss von TLR-SNPs auf Malaria	21
3	Diskussion	23
3.1	Zusammensetzung des LPS-Rezeptorkomplexes.....	23
3.2	Regulation der Immunantwort durch lösliche PRRs.....	24
3.3	TLR-SNPs und inflammatorische Erkrankungen	28
4	Zusammenfassung.....	34
5	Literatur.....	37
6	Danksagung.....	49
7	Erklärung.....	50

I Liste der Abkürzungen

APC	antigen presenting cell
BPI	bacterial permeability increasing protein
CHO	chinese hamster ovary
CRD	carbohydrate recognition domain
CRP	complement reactive protein
GDF	growth differentiation factor
GPI	glycosylphosphatidyl inositol
HDL	high density lipoprotein
HSP	heat shock protein
I κ BA	inhibitor kappaB alpha
IFN	interferon γ
IL	interleukin
LBP	LPS-binding protein
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
MBL	mannose binding lectin
MDP	Muramyl-dipeptid
MDP-mesoDAP	MDP-meso-diamino-Pimilinsäure
MHC	major histocompatibility complex
NBS-LRR	Nukleotid-Bindungsstelle-Leucin-reiche Region
NF κ B	nuclear factor kappaB
NOD1/2	nucleotide oligomerization domain 1/2
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PGN	Peptidoglykan
PGRP	peptidoglycan recognition protein
PRR	pattern recognition receptor
PTCA	percutane transluminale coronare angioplasty
SAP	Serum Amyloid Protein
SP-A	surfactant protein A
SNP	single nucleotide polymorphism
SR	scavenger receptor
TIR	toll/IL-1 receptor domain

TLR	toll-like receptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem hat die Aufgabe, die Abwehr bzw. Elimination von Pathogenen und infizierten bzw. entarteten körpereigenen Zellen zu gewährleisten. Es muss also in der Lage sein zwischen "Selbst" und "Nicht Selbst" zu unterscheiden. Weiterhin muss es in der Lage sein, zwischen "gesundem Selbst" und "infizierten" bzw. "entarteten Selbst" zu differenzieren. Um diese Aufgabe zu gewährleisten, hat sich im Laufe der Evolution ein äußerst komplexes System, bestehend aus einer Vielzahl von immunkompetenten Zellen, welche durch ein vielschichtiges Netzwerk von Botenstoffen miteinander kommunizieren, entwickelt. Ein komplexes Wechselspiel zwischen den verschiedenen Immunzellen erlaubt die Differenzierung zwischen "Selbst", "Nicht-Selbst" und "entartetem Selbst" durch drei Mechanismen: Erkennung von fremd ("microbial nonself"), Erkennung von nicht-Selbst ("missing self") und die Erkennung von verändertem Selbst ("altered self")¹⁻⁴.

Man unterscheidet das evolutionär weitaus ältere angeborene Immunsystem von dem, nur bei höheren Vertebraten vorkommenden, erworbenen Immunsystem. Die Erkennung von körperfremden Strukturen durch das angeborene Immunsystem erfolgt durch Keimbahn-kodierte Rezeptoren^{5, 6}, während beim erworbenen Immunsystem somatische Rekombinationen der T- und B-Zellrezeptorgene für eine hohe Diversität von antigenspezifischen Effektorzellen sorgen^{7, 8}, welche bei Antigenkontakt spezifisch expandieren und die spezifische Immunantwort vermitteln. Beim Menschen sind beide Systeme für die Initiierung einer vollständigen Immunantwort notwendig. Um eine Immunantwort des erworbenen Immunsystems aufzubauen, werden allerdings einige Tage vom Zeitpunkt der Pathogenerkennung an benötigt. Daher spielt das schnell reagierende angeborene Immunsystem in der frühen Phase der Pathogenabwehr eine entscheidende Rolle.

Der initiale Schritt einer Immunantwort gegen eingedrungene Pathogene durch das angeborene Immunsystem ist immer die Erkennung der Pathogene bzw. pathogener Strukturen, also die Erkennung von "Nicht-Selbst". Die Erkennung erfolgt über die sogenannten "pattern recognition receptors" (PRRs) welche "**p**athogen **a**ssociated **m**olecular **p**atterns" (PAMPs) erkennen, die nicht vom Wirt sondern nur von Mikroorganismen exprimiert werden⁹⁻¹¹. Auf der anderen Seite gibt es Moleküle, die nur vom Wirt exprimiert werden und somit eine weitere Möglichkeit zur Erkennung von "Selbst" darstellen. Hierzu gehören z.B. die MHC Klasse I Moleküle, welche ubiquitär exprimiert und nach viraler Infektion oder Entartung körpereigener Zellen „herrunterreguliert“ werden, wodurch das

Abtöten solcher Zellen z. B. durch so genannte "Natürliche Killer Zellen" ermöglicht wird¹². Weiterhin gehören hierzu Moleküle des Komplementsystems (CD46, CD55, CD59), welches ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems ist. Die Moleküle CD46, CD55 und CD59 werden nur auf körpereigenen Zellen exprimiert und schützen diese vor dem Angriff des Komplementsystems¹⁴. Der dritte Mechanismus der Erkennung von "verändertem" oder "entartetem Selbst" beinhaltet die Expression von spezifischen Molekülen auf Zellen in denen z. B. durch Transformation oder virale Infektion die Apoptose induziert wurde, um diese dann für Phagozyten oder natürliche Killerzellen zugänglich zu machen¹⁵.

Eine weitere wichtige Funktion des angeborenen Immunsystems ist die Aktivierung des erworbenen Immunsystems durch die Hochregulation von co-stimulatorischen Molekülen (CD80, CD86 und MHC-II), wodurch eine schnelle klonale Expansion der antigenspezifischen T- und B-Zellen erst ermöglicht wird. Das Zusammenspiel von angeborenem und erworbenem Immunsystem erfolgt durch die Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) des angeborenen Immunsystems, welche prozessierte Antigenpeptide in Assoziation mit MHC II und co-stimulatorischen Molekülen den Effektorzellen des erworbenen Immunsystems präsentieren. APCs sind nicht antigenspezifisch und prozessieren und präsentieren Antigene unabhängig davon ob es "Selbst-" oder "Fremd-" Antigene sind. Um eine antigen-spezifische Stimulation des erworbenen Immunsystems zu gewährleisten, werden co-stimulatorische Moleküle auf den APCs nur nach vorheriger Stimulation der PRRs durch die entsprechenden PAMPs heraufreguliert^{2, 16}.

1.2 Das angeborene Immunsystem

Den ersten Schutz des Wirts gegenüber Infektionen stellen die inneren und äußeren Epithelien dar, welche unter anderem antibakterielle Substanzen sezernieren. Wenn Mikroorganismen diese erste Barriere überwunden haben, werden sie von den Monozyten/Makrophagen und den dendritischen Zellen, den wichtigsten Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, erkannt, welche dann weitere Effektorzellen wie z.B. neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen sowie auch das erworbene Immunsystem aktivieren⁶.

Bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch eingedrungene Pathogene spielen die keimbahnkodierte PRRs bei der Erkennung der PAMPs eine zentrale Rolle. Zu den membranständigen PRRs gehören z.B. die Komplementrezeptoren, die Scavenger Rezeptoren, CD14 und die sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLRs). Weiterhin gibt es

lösliche PRRs wie z.B. das Mannose-bindende Lectin (MBL), Komplement, CRP, das LPS-binding Protein, und das sCD14. Schließlich sind auch intrazelluläre PRRs beschrieben, wie z.B. die Nod1/2 Moleküle.

Die Bindung der PAMPs an diese Rezeptoren führt zur Aktivierung einer Vielzahl von Effektorzellen, wie z.B. Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und natürlichen Killerzellen. Das koordinierte Zusammenspiel der verschiedenen Effektorzellen wird durch Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. Interleukin (IL)-1, -6, und -12, Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α , Interferon (IFN)- γ und Chemokinen wie z.B. IL-8 gewährleistet. Zytokine wie IL-1 oder TNF- α aktivieren z.B. auch das Endothel am Ort der Infektion und Chemokine wie z.B. IL-8 locken weitere Effektorzellen an. Anti-inflammatorische Zytokine wie z.B. IL-4 und IL-10 führen dann zu einer Limitierung der Entzündungsreaktion. Eine wohldosierte Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren ist wichtig, da eine überschießende oder systemische Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren fatale Folgen hat und im septischen Schock, gekennzeichnet durch Abfall des Blutdrucks, vaskulären Kollaps und letztendlich dem Multiorganversagen, enden kann¹⁷⁻¹⁹.

Die Stimulation über PRRs und die Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren gewährleistet auch die Aktivierung des erworbenen Immunsystems²⁰. Durch die Hochregulation der co-stimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und MHC-II Expression auf APCs wird eine spezifische Aktivierung des angeborenen Immunsystem ermöglicht, indem prozessierte Antigene durch die MHC-II Moleküle zusammen mit CD80 und CD86 den T-Zellen präsentiert werden, welche dann ihrerseits spezifisch B-Zellen aktivieren (Abb.1). Der Zusammenhang zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem wird seit langem ohne Wissen der genauen Mechanismen z. B. durch den Einsatz von hitzegetöteten *M. tuberculosis*-Bakterien als Freund's Adjuvants bei der Impfung mit Protein-Antigenen genutzt. Der Einsatz von Adjuvantien führt dabei in der Regel zu einem weitaus besseren Impferfolg.

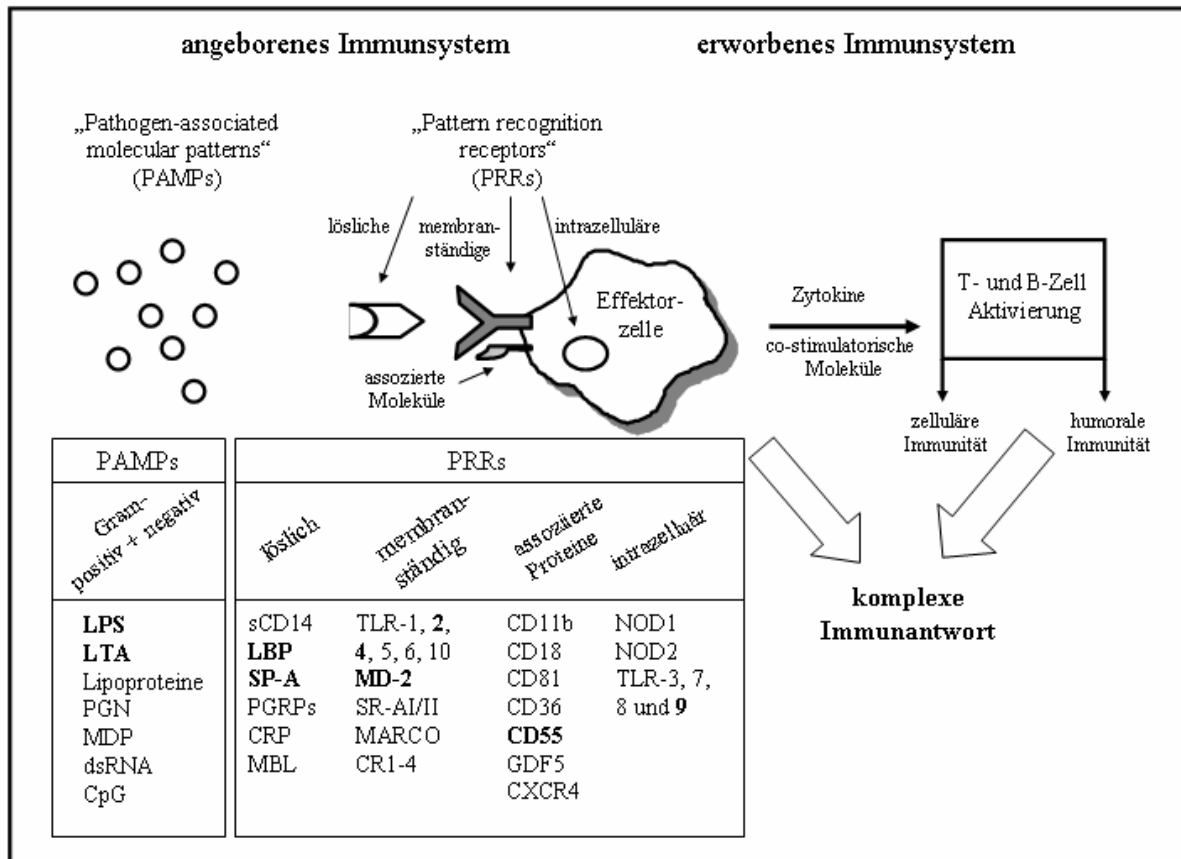


Abb.1: Schematische Darstellung des angeborenen Immunsystems sowie dessen Wechselwirkung mit dem erworbenen Immunsystem.

LPS: Lipopolysaccharid, LTA: Lipoteichonsäure, PGN: Peptidoglykan, MDP: Muramyldipeptid, LBP: "LPS-binding protein", SP-A: "surfactant protein A", PGRP: "PGN-recognition protein", CRP: C-reaktives Protein, MBL: "mannose-binding lectin", SR: Scavengerrezeptor, CR: Komplementrezeptor, GDF: "growth differentiation factor", CXCR: Chemokine Rezeptor, NOD: "nukleotide-binding oligomerization domain". Zu den fettgedruckten Molekülen wurden in den hier vorgelegten Arbeiten bzw. in weiteren eigenen Arbeiten Beiträge geleistet.

1.3 "pathogen associated molecular patterns" (PAMPs)

Das angeborene Immunsystem muss mit Hilfe einer relativ geringen Anzahl von keimbahnkodierten Rezeptoren die gesamte Vielfalt der mikrobiellen Organismen erkennen. Als Zielmoleküle eignen sich somit nur Strukturen die hochkonserviert sind und nur von Mikroorganismen, nicht aber vom Menschen exprimiert werden. Moleküle, welche am Aufbau der mikrobiellen Zellwand beteiligt sind eignen sich hierfür besonders, da sie aufgrund ihrer essentiellen Funktion hochkonserviert sind. Variationen innerhalb dieser Moleküle sind sehr selten, da sie in der Regel mit der Integrität der bakteriellen Zellwand nicht vereinbar sind. Eine weitere wichtige Eigenschaft dieser Zielmoleküle ist deren konstitutive Expression, um eine sichere Erkennung der Pathogene zu gewährleisten. Pathogenitätsfaktoren, welche in der Regel induzierbar und innerhalb verschiedener Spezies wenig konserviert sind, eignen sich daher nicht als Zielmoleküle für das angeborene Immunsystem. Diese Eigenschaften potentieller Zielmoleküle des angeborenen Immunsystems wurden daher schon 1989 von Charles Janeway postuliert⁹.

Dementsprechend sind diese Moleküle, bis auf einige Ausnahmen, bakterielle Zellwand-Bestandteile (Abb. 2). In der Regel bestehen sie aus einem über viele Spezies konservierten und einem weniger konservierten Bereich und werden als "pathogenassoziierte molekulare Muster (patterns)" (PAMPs) bezeichnet. Die Struktur und die Bestimmung des kleinsten biologisch aktiven Prinzips ist zur Zeit bei vielen PAMPs noch unklar. In der letzten Zeit wurden auch Strukturen, die nicht auf die mikrobielle Welt beschränkt sind, als mögliche Liganden der PRRs identifiziert. So wurde z.B. gezeigt das hypomethylierte bakterielle DNA²¹, einzelsträngige virale RNA²² und doppelsträngige virale DNA²³ in der Lage sind, das Immunsystem über die PRRs zu aktivieren. Diese Strukturen treten auch im Wirt (Mensch) auf, eine Erkennung als PAMP setzt aber die Lokalisation dieser Strukturen in gewissen Zellkompartimenten voraus, in denen die entsprechenden Wirtsmoleküle in der Regel nicht vorkommen. Eine Übersicht der verschiedenen PAMPs ist in Tabelle 1 dargestellt.

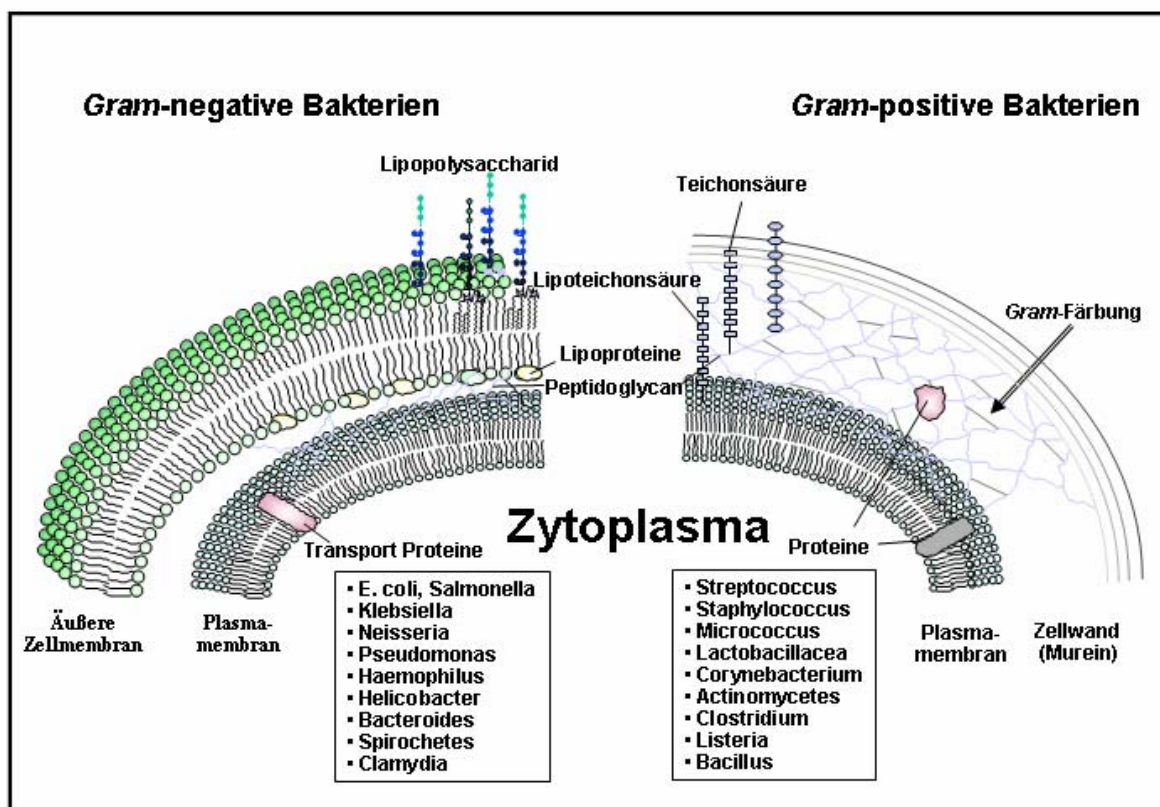


Abb. 2: Schematische Darstellung des Aufbaus der Zellwände von *Gram*-negativen und *Gram*-positiven Bakterien. Modifiziert, nach Schumann 1995²⁴.

1.3.1 Lipopolysaccharid (LPS)

Das am intensivsten untersuchte PAMP ist das Lipopolysaccharid (LPS) der *Gram*-negativen Bakterien, welches aus dem hoch konservierten Lipid A, einem semi-konservierten Kernbereich und einer variablen Zuckerkette, die speziesspezifisch ist, besteht (Abb. 3). Das Lipid A ist dabei das immunstimulatorische Prinzip des LPS²⁵. LPS war das erste beschriebene mikrobielle Molekül mit immunmodulatorischen Eigenschaften, weshalb viele wegweisende Entdeckungen das angeborene Immunsystem betreffend im Rahmen der LPS-Forschung gemacht wurden. Eine hitzestabile toxische Substanz aus bakteriellen Zellwänden wurde schon Ende des 19. Jahrhunderts als „Endotoxin“ beschrieben²⁶.

Tabelle 1: Auflistung der wichtigsten PAMPs

PAMP	Vorkommen	konservierte/aktive Struktur	Rezeptor
Lipopolysaccharid	GNB	Lipid A	TLR-4
Peptidoglykan	GPB + GNB	Glucosamin/Muramyl-Peptid	NOD1/2
Lipoproteine	GNB	N-terminaler Lipidanker	TLR-2
Lipoteichonsäuren	GPB	Lipidanker	TLR-2
Flagelin	GNB + GPB	nicht bekannt	TLR-5
CpG-reiche DNA	GNB + GPB + Viren	nicht methylierte CpG Nukleotide	TLR-9
dsRNA	Viren	endosomales Auftreten	TLR-8
ssRNA	Viren	endosomales Auftreten	TLR-3

GNB: *Gram*-negative Bakterien; GPB: *Gram*-positive Bakterien

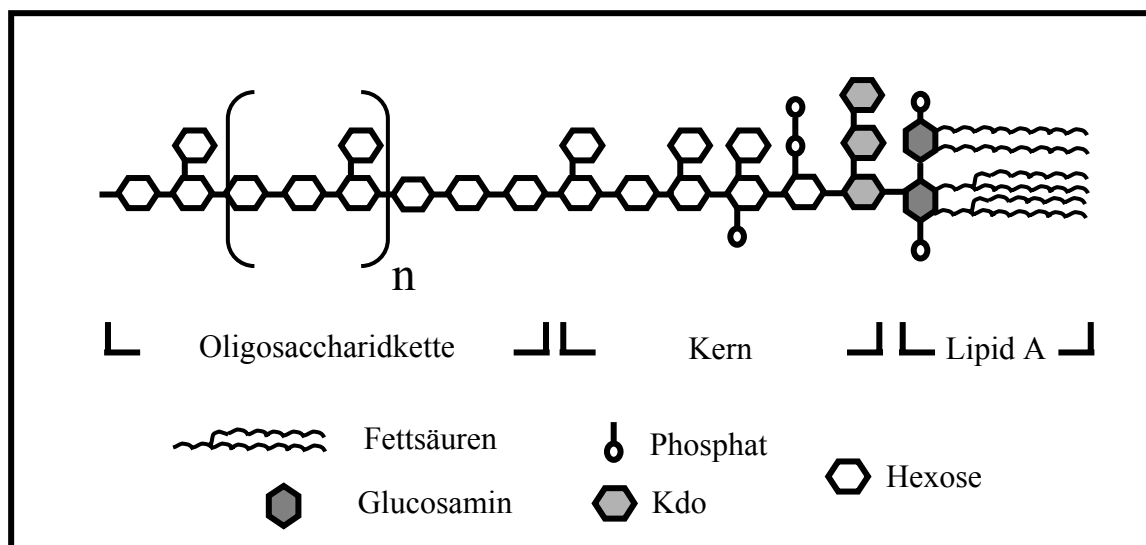


Abb. 3: Struktur des Lipopolysaccharids

Nachdem Ende der 1940er Jahre eine Zucker- und Lipid-haltige Substanz aus Zellwänden *Gram*-negativer Bakterien isoliert und als Lipopolysaccharid definiert wurde, ging die strukturelle Aufklärung des LPS schnell voran. 1966 wurde die Grundstruktur von LPS entschlüsselt und kurz darauf auch die Struktur des Lipid A, welches das „endotoxische Prinzip“ des LPS ist, aufgeklärt²⁷. Anfang der 90-er Jahre wurden die LPS-bindenden Proteine CD14 und "LPS-binding protein" (LBP) entdeckt: CD14 ist ein glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankertes Membranprotein, das vor allem auf myeloiden Zellen aber auch auf epithelialen und endothelialen Zellen exprimiert wird und LPS bindet²⁸. LBP ist ein Serumprotein, welches die Bindung von LPS an CD14 katalysiert²⁹. Da CD14 ein GPI-verankertes Molekül ist, kann es kein Signal in das Zellinnere übertragen. Ende der neunziger Jahre wurde dann durch genetische Analysen eine schon seit den sechziger Jahren bekannte Mutation in einem LPS-resistenten Mausstamm kartiert und als kodierende Mutation im Toll-like Rezeptor 4 (TLR-4) Gen identifiziert³⁰. Mit der Entdeckung des TLR-4 als zentralem, und signaltransduzierendem Bestandteil der Immunantwort auf LPS expandierte die Forschung auf dem Gebiet der angeborenen Immunität und es wurden in kurzer Zeitfolge weitere neun humane TLRs identifiziert und funktionell charakterisiert^{9-11, 20}. Mit der Kenntnis der zentralen Rolle der TLRs als PRRs in der angeborenen und auch adaptiven Immunität wurden durch die hier dargestellten Arbeiten und die anderer auch Assoziationen von Polymorphismen in diesen Genen mit einer Vielzahl von Krankheiten untersucht. Eine historische Übersicht zur Endotoxinforschung ist in Abb. 4 dargestellt.

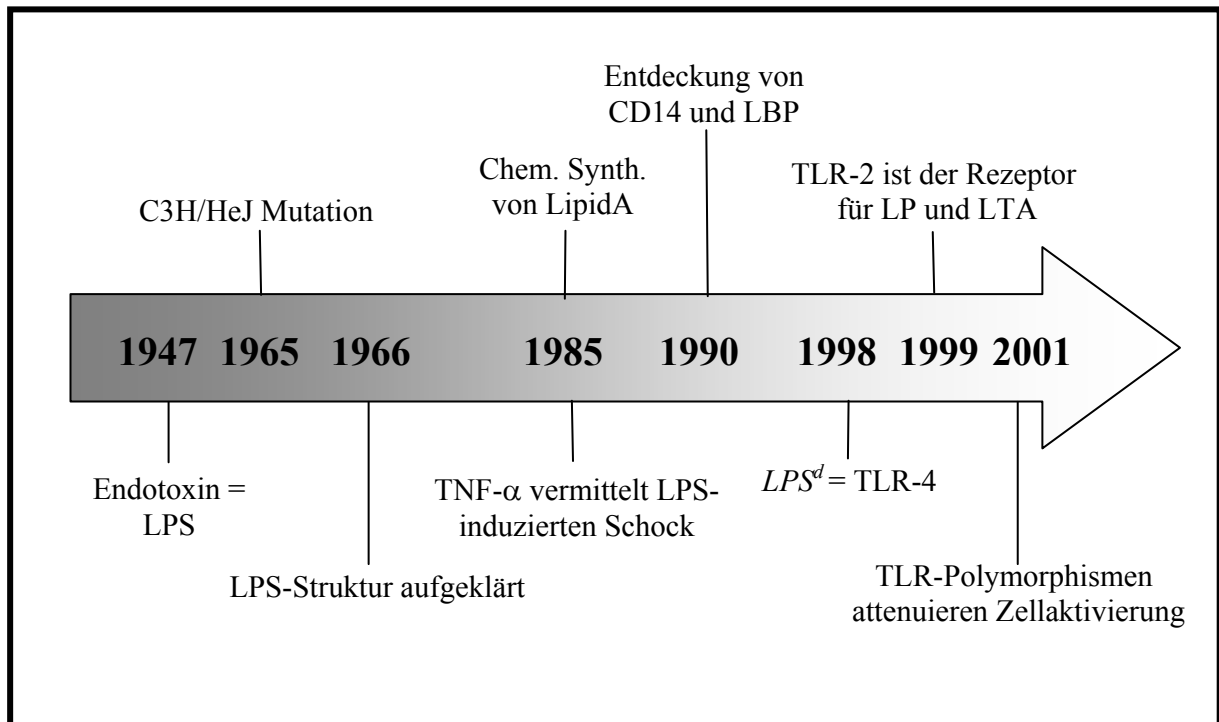


Abb. 4: Historischer Überblick zur Endotoxinforschung (modifiziert nach Beutler und Rietschel²⁵). LPS: Lipopolysaccharid, TNF- α : Tumor Nekrose Faktor α , TLR: Toll-like Rezeptor, LBP: LPS-bindungs Protein, LP: Lipoproteine, LTA: Lipoteichonsäure.

1.4 "pattern recognition receptors" (PRRs)

Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkennen sogenannte pathogenassoziierte Muster und werden dementsprechend als "pattern recognition" Rezeptoren (PRRs) bezeichnet⁹. Unter den PRRs stellen die Toll-like Rezeptoren die größte Familie dar und nehmen eine zentrale Stellung ein, da sie sowohl PAMPs von Bakterien, Viren und Parasiten, als auch endogene, sogenannte "danger"-Signale erkennen¹¹. Dennoch gibt es eine Reihe anderer Proteinfamilien, deren Mitglieder zum Teil den PRRs zugeordnet werden. Hierzu gehören z.B. die C-Typ Lektine "surfactant protein A" (SP-A) und "mannose binding lectin" (MBL), die Lipidtransfer Proteine LPS-bindendes Protein (LBP) und Bakterien permeabilisierendes Protein (BPI), die zytoplasmatischen Nukleotid-oligomerisierungs Domäne (NOD)-Proteine, sowie die Scavengerrezeptoren und andere^{31, 32}. Bei den PRRs handelt es sich nicht nur um membranständige sondern z. T. auch um zytosolische oder sezernierte Moleküle. Die TLRs 1, 2, 4, 5, 6 und 10 sowie CD14 werden

vorwiegend an der Zelloberfläche immunkompetenter Zellen exprimiert. Bezüglich TLR-4 konnte allerdings gezeigt werden, dass es auch in koronaren Epithelzellen auf Membranen intrazellulärer Kompartimente lokalisiert, und dort auch funktionell aktiv ist³³. Die TLRs 3, 7, 8 und 9 sind in der Regel auf endosomalen Membranen lokalisiert^{22, 34, 35}. Die TLRs zeichnen sich durch eine extrazelluläre Leucin-reiche Domäne (LRR) und eine intrazelluläre Toll/IL-1 Rezeptor (TIR)-Domäne aus. Die LRRs sind verantwortlich für die Bindung der Liganden und sind charakteristisch für die TLRs, CD14 und die NOD-Proteine³⁶⁻³⁸. Die TIR-Domäne hingegen initiiert die Signaltransduktion und ist homolog mit den Rezeptoren der IL-1 Familie¹⁰. Die NOD-Proteine werden nur zytosolisch exprimiert³⁹. PRRs wie z.B. LBP oder SP-A sind sezernierte Proteine und beeinflussen im Wesentlichen die Interaktion der PAMPs mit den signaltransduzierenden membranständigen oder zytosolischen PRRs.

1.4.1 Membranständige PRRs

Unter den membranständigen PRRs ist der Toll-like Rezeptor-4, welcher LPS erkennt, der am besten charakterisierte. Es konnte gezeigt werden, dass der vollständige Rezeptorkomplex sich erst durch Bindung des Liganden aus einer Vielzahl von Molekülen zusammensetzt⁴⁰. Neben CD14 und MD-2, welche beide für die sensitive LPS-induzierte Signaltransduktion essentiell sind, konnte auch für andere Moleküle wie z. B. den Scavenger Rezeptor CD36 und die Integrine CD11b, CD18 eine LPS-induzierte co-Lokalisation mit TLR-4 gezeigt werden⁴⁰. CD14 kommt sowohl als membranständiges, GPI-verankertes Molekül auf monozytären Zellen, als auch als löslicher PRR im Serum vor⁴¹. Neben LPS wird auch die durch Lipoteichonsäure induzierte Zellaktivierung durch CD14 vermittelt⁴². CD14 ist ein multifunktionelles Molekül, das auch apoptotische Zellen bindet und deren Phagozytose beschleunigt^{43, 44}. Die Zusammensetzung des Rezeptorkomplexes ist für die induzierte Zytokinausschüttung essentiell, so ist z. B. die Expression von CD11b/CD18 für die LPS-induzierte Freisetzung von IL-12 und Cox-2 notwendig, die Induktion von TNF- α wird hiervon hingegen nicht beeinflusst⁴⁵. Weitere Bestandteile des LPS-Rezeptorkomplexes sind die "heat shock" Proteine HSP70 und HSP90, der Chemokinrezeptor 4 sowie der "growth differentiation factor" 5⁴⁶. Die Funktion der letztgenannten Co-Faktoren ist bis heute nicht bekannt. Für den Toll-like Rezeptor 4 ist weiterhin gezeigt, dass dieser Rezeptor in koronaren Endothelzellen im Gegensatz zu myeloiden Zellen intrazellulär exprimiert wird und die LPS-induzierte Aktivierung dieser Zellen erst nach Internalisierung von LPS erfolgt. Die Internalisierung wird durch den löslichen PRR LBP katalysiert³³.

1.4.2 Sezernierte PRRs

Zu den sezernierten (löslichen) PRRs gehören vor allem die TLR-assoziierten Proteine "LPS-binding protein" (LBP), lösliches CD14 (sCD14) und MD-2, sowie die beiden großen Gruppen der Pentraxine⁴⁷ und der Kollektine⁴⁸.

Lösliches CD14 (sCD14 von „soluble“) bindet das gleiche Ligandenspektrum wie membranständiges CD14 (mCD14) und leitet diese dem mCD14-Molekül bzw. dem entsprechenden TLR zu und ermöglicht so eine sensitivere Aktivierung mCD14-negativer Zellen, wie z. B. Endothelzellen⁴⁹. Hohe Serumspiegel von sCD14 hingegen führen durch Konkurrenz mit mCD14 zu einer Hemmung der LPS-induzierten Aktivierung von Monozyten⁵⁰.

LBP katalysiert die Bindung von LPS an mCD14 und sCD14 und erhöht dadurch die Sensitivität gegenüber LPS um mehrere Potenzen. Dieser katalytische LBP-Effekt wird durch die niedrigen, physiologischen, Serumkonzentrationen von LBP gewährleistet^{28, 29, 51}. Die physiologische Konzentration von LBP im Serum des Menschen liegt bei ca. 5 - 10 µg/ml, kann sich aber in der Akutphase einer Infektion auf bis zu 200 µg/ml erhöhen^{52, 53}. Es konnte gezeigt werden, daß diese hohen LBP-Konzentrationen im Gegensatz zu den physiologischen LBP-Konzentrationen die LPS-induzierte Zellaktivierung inhibieren⁵⁴⁻⁵⁶. LBP ist strukturell mit dem "bactericidal/permeability increasing protein" (BPI) verwandt und beide gehören zu einer Familie Lipid-bindender Proteine⁵⁷. BPI bindet ebenfalls LPS, leitet dies aber nicht an CD14 weiter und trägt somit zur LPS-Detoxifizierung bei⁵⁷.

MD-2, eine weiterer PRR im Serum, wird von verschiedenen Zelltypen exprimiert und ist ein essentieller Bestandteil des LPS-Rezeptorkomplexes bestehend aus CD14/MD-2 und TLR-4^{58, 59}. MD-2 wird zusammen mit TLR-4 prozessiert und an die Zelloberfläche transportiert, von wo aus dann ein Teil des MD-2 in das extrazelluläre Milieu abgegeben wird⁶⁰⁻⁶². Lösliches MD-2 gewährleistet die LPS-induzierte Aktivierung von Zellen, die TLR-4, nicht aber MD-2 exprimieren, wohingegen die Aktivierung von z. B. Monozyten, welche MD-2 und TLR-4 exprimieren, durch lösliches MD-2 gehemmt wird⁶³.

Bei den Pentraxinen ist vor allem das C-reaktive Protein (CRP) zu nennen. CRP bindet neben anderen Molekülen auf Bakterien exprimiertes Phosphorylcholin, das aber auch von apoptotischen Zellen freigesetzt wird^{64, 65}. Es erkennt also sowohl körperfremde als auch körpereigene "danger"-Signale. Durch Liganden aggregiertes CRP aktiviert das Komplementsystem und induziert die Phagozytose von z. B. apoptotischen Zellen⁶⁶. Ein weiteres Pentraxin das in die Phagozytose von z.B. Zymosan oder apoptotischen Zellen über Fc-Rezeptoren involviert ist, ist das Serum Amyloid Protein (SAP)⁶⁷.

Zu den Kollektinen gehören z. B. das mannosebindende Lektin (MBL) und auch die Surfactant Proteine SP-A und -D, welche durch das Vorhandensein einer "carbohydrate recognition domain" (CRD) gekennzeichnet sind^{68, 69}. MBL ist in der Lage, Kohlehydrate auf Oberflächen von Pathogenen, wie z. B. Bakterien, Viren und Pilzen von denen auf körpereigenen Zellen zu unterscheiden und spezifisch zu binden. Die Bindung von MBL an bakterielle Zelloberflächen führt zu Aktivierung des Komplementsystems und letztendlich zur Lyse der Pathogene⁶⁹. Ebenso wie MBL sind die Surfactant-Proteine Opsonine für Bakterien, Viren und Pilze und beschleunigen die Phagozytose dieser Pathogene. Die Surfactantproteine werden im wesentlichen in der Lunge exprimiert und haben auch direkte bakterizide Wirkung⁶⁸.

1.4.3 Zytoplasmische PRRs

Zytoplasmische PRRs sind verantwortlich für die intrazelluläre Erkennung von Pathogenen und deren Zellwandbestandteilen. Die wohl wichtigste Familie zytoplasmischer PRRs sind die NBS-LRR Proteine (auch als NOD-Proteine bezeichnet), welche durch den Besitz einer Nukleotid-Bindungsstelle (NBS), auch als Nukleotidoligomerisierungsdomäne (NOD) bezeichnet, und einer Leucin-reichen Region (LRR) gekennzeichnet sind^{36, 70}. Die Aktivierung dieser Rezeptoren steuert zum einen pro-inflammatorische, zum anderen aber auch apoptotische Prozesse⁷¹. Die Induktion der Apoptose von infizierten Zellen ist eine der ältesten Mechanismen der angeborenen Immunität⁷². Die am besten erforschten Mitglieder dieser Proteinfamilie sind das NOD-1 und -2, welche beide durch Untereinheiten des Peptidoglykans aktiviert werden. Die minimale Struktur, welche NOD-1 aktiviert, ist das Muramyltripeptid (MDP-mesoDAP), welches vorwiegend ein Bestandteil des Peptidoglykans *Gram*-negativer Bakterien ist⁷³. NOD-2 wird durch das ubiquitär vorkommenden Muramyl-dipeptid aktiviert^{31, 74}.

1.5 Polymorphismen in Genen des angeborenen Immunsystems

Generell spielen neben Umwelteinflüssen genetische Faktoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf von Krankheiten. Genetische Risikofaktoren sind für viele Krankheiten, wie z. B. Asthma, Krebs, Diabetes und Herz/Kreislaufkrankungen beschrieben worden. Das schnell wachsende Feld der "Genomics" spielt eine immer wichtigere Rolle für das Verständnis von Krankheitsentwicklungen, aber auch bei der Entwicklung neuer Medikamente und Therapien⁷⁵. Schon vor längerer Zeit wurde gefunden, daß genetische Einflüsse bei Infektionskrankheiten im Vergleich zu Krebs oder kardiovaskulären Erkrankungen am stärksten vertreten sind⁷⁶. Die häufigsten Variationen im humanen Genom, welche Risikofaktoren für die verschiedensten Krankheiten darstellen, sind "single nucleotide polymorphisms" (SNPs), von denen ca. 50.000 - 250.000 im menschlichen Genom vermutet werden⁷⁷. Eine Vielzahl von SNPs wurde bereits mit Infektionskrankheiten wie z. B. Malaria, HIV und Hepatitis assoziiert⁷⁸. Auch in den PRRs sind entsprechend häufig SNPs nachgewiesen worden⁷⁹. Informationen zu Assoziationen mit verschiedenen Krankheiten sind dabei aber in der noch jungen Literatur dazu oft widersprüchlich. Eindeutig gezeigt wurde, dass SNPs im NOD-2 Gen Risikofaktoren für Morbus Crohn und das Blau-Syndrom, eine granulomatöse chronische Entzündung, sind^{80, 81}. Bezüglich der TLRs sind die Daten zu SNPs und Krankheitsanfälligkeit bisher eher widersprüchlich: Es wurden zwei häufig auftretende funktionelle Polymorphismen im TLR-4 Gen und ein funktioneller Polymorphismus im TLR-2 Gen gefunden^{82, 83}. Es konnte dabei gezeigt werden, dass TLR-4 Polymorphismen einen schützenden Effekt bezüglich Atherosklerose und Legionelleninfektionen haben^{84, 85}. Weiterhin gibt es zwei Studien, die zeigen, dass genau diese Polymorphismen Risikofaktoren für Gram-negative Infektionen darstellen^{86, 87}. In Bezug auf den TLR-2 Polymorphismus und der Suszeptibilität für *S. aureus* Infektionen gibt es zwei widersprüchliche Arbeiten, von denen die erste, deutlich kleinere, einen Zusammenhang zwischen dieser Mutation und der Anfälligkeit für *S. aureus* Infektionen postulierte, was in einer zweiten, großen Studie aber nicht bestätigt werden konnte^{83, 88}.

2 Zielsetzung und Ergebnisse der eigenen Arbeit

Die Induktion einer Immunantwort auf eingedrungene Pathogene ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zelltypen und Mediatoren. Die angeborene Immunantwort spielt für diesen Prozess eine zentrale Rolle, da sie zum einen die erste Reaktion des Wirtes auf das Pathogen darstellt, und zum anderen die Induktion der erworbenen Immunität erst initiiert. Im Zentrum der angeborenen Immunreaktion stehen die TLRs als größte Familie der "pattern recognition receptors" (PRRs) welche die sogenannten „pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) erkennen und dann die Immunreaktion auf eingedrungene Pathogene initiieren. Die sensitive Erkennung der PAMPs sowie die spezifische Immunantwort wird zusätzlich durch weitere PRRs und die spezifische Zusammensetzung des Rezeptorkomplexes reguliert. Entsprechend dieser zentralen Position der PRRs spielen "single nucleotide polymorphisms" (SNPs) in den entsprechenden Genen bei der Pathogenese von Infektionskrankheiten und chronisch-inflammatorischen Prozessen möglicherweise eine wichtige Rolle. Die Zielsetzung der Arbeit fokussiert sich daher auf drei Schwerpunkte:

1. Identifizierung neuer PRRs des LPS-Rezeptorkomplexes
2. Funktionelle Charakterisierung des LPS-bindenden Proteins (LBP)
3. Assoziation von Polymorphismen in PRR-Genen mit inflammatorischen Erkrankungen

2.1 Identifizierung neuer PRRs des LPS-Rezeptorkomplexes

Eigene Arbeiten:

El-Samalouti V.T., Schletter J., Chyla I., Lentschat A., Mamat U., Brade L., Flad H.D., Ulmer A.J. and Hamann L. Identification of the 80-kDa LPS-binding protein (LMP80) as decay-accelerating factor (DAF, CD55). 1999. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 23, 259-269.

Heine H., Ulmer A.J., El-Samalouti V.T., Lentschat A., and Hamann L. Decay accelerating factor (DAF/CD55) is a functional active element of the LPS receptor complex. 2001. J. Endotoxin Res., 7, 227-31.

Aufgrund von Urheberrechten sind die Originalarbeiten hier nicht abgedruckt.

Einleitung

Zu Beginn der Arbeiten waren bezüglich des LPS-Rezeptors nur CD14, LBP und die β -Integrine CD11a und CD18 als Rezeptoren bekannt^{28, 29, 89}. Da alle diese Moleküle keine signaltransduzierende Domäne tragen, war ein Ziel der vorliegenden Arbeiten, weitere Moleküle des LPS-Rezeptorkomplexes zu identifizieren. Hierzu wurde ein "Ligand-Blotting-Assay" etabliert mit dessen Hilfe ein LPS-bindendes 80-kDa Membranprotein isoliert und als CD55 identifiziert wurde.

Zusammenfassung

In den zuvor genannten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Überexpression von CD55 in "chinese hamster ovary" (CHO)-Zellen zu einer Verstärkung der LPS-induzierten Translokation von NF κ B führt. Im Vergleich der LPS-induzierten Zellaktivierung zwischen CHO-Zellen die mit CD14, CD55 oder mit dem leeren Vektor transfiziert wurden, ergab sich in etwa das gleiche Aktivierungspotential für CD14- und CD55-transfizierte Zellen.

CD55 ist ein Membranprotein, welches im Komplementsystem eine wichtige Rolle spielt⁹⁰. Da CD55, ebenso wie CD14, ein GPI-verankertes Protein ist, konnte es ebenfalls nicht der gesuchte Signalüberträger sein. Es ist beschrieben worden, dass der LPS-Rezeptor ein aus vielen Proteinen zusammengesetzter Komplex ist, in dem auch Proteine ohne signaltransduzierende Eigenschaften die LPS-induzierte Freisetzung von Zytokinen

beeinflussen wie z.B. CD11b/CD18 und CD36^{40, 45, 91}. Von daher ist anzunehmen, dass CD55 auf ähnliche Weise die Zellaktivierung durch LPS beeinflusst.

2.2 Funktionelle Charakterisierung des LPS-bindungs Protein

Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass hohe LBP-Konzentrationen anti-inflammatorische Effekte haben. In den vorliegenden Arbeiten wurden die Mechanismen dieser anti-inflammatorischen Effekte näher untersucht.

Eigene Arbeiten:

Hamann L., Schumann R.R., Flad H.-D., Brade L., Rietschel E. Th., and Ulmer A.J. Binding of lipopolysaccharide (LPS) to CHO cells does not correlate with LPS-induced NF κ B activation. 2000. Eur. J. Immunol., 30, 211-216.

Hamann L., Stamme C, Ulmer A.J., and Schumann R.R. Inhibition of LPS-induced activation of alveolar macrophages by high concentrations of LPS-binding protein. 2002. Biochem. Biophys. Res. Commun., 295, 553-60.

Hamann L., Alexander C., Stamme C., Zahringer U., and Schumann R.R. Acute-phase concentrations of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) inhibit innate immune cell activation by different LPS chemotypes via different mechanisms. 2005. Infect. Immun., 73, 193-200.

Einleitung

Im Gegensatz zu der Funktion niedriger Konzentrationen von LBP war die Rolle der erhöhten LBP-Konzentrationen in der Akutenphase bisher nicht ausreichend untersucht. Es konnte hier gezeigt werden, dass hohe LBP-Konzentrationen die LPS-induzierte Zellaktivierung inhibieren und somit zur Herabregulation einer Entzündungsreaktion beitragen können. Ob es unter diesen Bedingungen zu einem verstärkten Transport von LPS an "high density lipoprotein" HDL oder zu einer verstärkten Internalisierung von LPS ohne Zellaktivierung kommt, war die Fragestellung der folgenden Arbeiten.

Zusammenfassung

Durch den Einsatz transfizierter "chinese hamster ovary" (CHO)-Zellen, die durch einen GPI-Anker an der Zellmembran verankertes LBP exprimieren, konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Bindung von LPS nicht zu einer verstärkten Zellaktivierung führt. Dieser Befund bestätigt frühere Vermutungen, dass der LPS-Aufnahme und der LPS-induzierten

Zellaktivierung unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen⁹². Diese Hypothese wurde auch von Tapping et al.⁹³ bestätigt. Bezüglich der Inhibition der LPS-induzierten Zellaktivierung durch hohe Konzentrationen von LBP konnten zellspezifische Unterschiede nachgewiesen werden. Der inhibitorische Effekt von hohen LBP-Konzentrationen konnte auch an immunkompetenten Zellen der Lunge nachgewiesen werden, wobei die Inhibition primärer Alveolarmakrophagen mit einem verminderten LPS-„uptake“ in Gegenwart hoher LBP-Konzentrationen einhergeht. Dies wurde auch anhand von humanen Monozyten gezeigt⁵⁴. Im Gegensatz dazu wird LPS verstärkt von der Lungenepithelzelllinie A549, welche selbst in der Lage ist, LBP zu exprimieren⁹⁴, unter hohen LBP-Konzentrationen aufgenommen, ohne diese zu aktivieren. Auch CHO-Zellen sind in der Lage, unter hohen LBP-Konzentrationen verstärkt LPS aufzunehmen bei gleichzeitiger Inhibition der NFκB-Translokation. Der Mechanismus dieses von uns so genannten "silent uptake" ist jedoch vom LPS-Chemotyp abhängig. Während kurzkettiges LPS unabhängig von der Serumkonzentration verstärkt internalisiert wird, trifft dies für langkettiges LPS nur in Abwesenheit von Serum zu. In Anwesenheit von Serum bzw. HDL dominiert die LPS-Bindung an HDL gegenüber der Bindung an zelluläres CD14. Hohe LBP-Konzentrationen führen im Fall von langkettigem LPS also zur Detoxifizierung über Serumproteine. Unabhängig vom LPS-Chemotyp ist die Inhibition des LPS-Transfers von LBP auf CD14, welche einen essentiellen Schritt in der LPS-induzierten Zellaktivierung darstellt.

2.3 SNPs in PRR-Genen und inflammatorische Erkrankungen

Bezüglich TLR-2 und -4 gibt es mindestens drei relativ häufig vorkommende funktionelle Polymorphismen, rs5743708, rs4986790 und rs4987233. Der Einfluss dieser Polymorphismen auf die Suszeptibilität oder Pathogenese verschiedener entzündlicher bzw. infektiöser Erkrankung war bisher nicht ausreichend bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden TLR-4 Polymorphismen einen schützenden Effekt bezüglich Atherosklerose und der Legionärerkrankung haben^{84, 85}. Andere Arbeiten zeigen, dass TLR-2 - und TLR-4 - Polymorphismen einen Risikofaktor für *Gram*-positive und *Gram*-negative Infektionen darstellen^{83, 86}. Eine Ursache für die sich häufig widersprechenden Ergebnisse ist die geringe Probandenzahl der meisten Studien, weshalb eine Verifikation vieler Studien sinnvoll erscheint.

Eine der weltweit häufigsten Infektionskrankheiten mit ca. 1-3 Millionen Toten pro Jahr ist die Malaria⁹⁵. Eine Vielzahl genetischer Prädispositionen, welche die Suszeptibilität für Malaria beeinflussen, sind bekannt⁹⁶⁻⁹⁸. Ein Molekül, welches das Immunsystem des Wirts bei einer *Plasmodium falciparum* Infektion aktiviert, ist das Glycosylphosphatidylinositol (GPI) des Parasiten⁹⁹. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass dieses Molekül die natürliche Immunantwort TLR-vermittelt aktiviert¹⁰⁰. Eine Untersuchung zum Einfluss der TLR SNPs auf die Suszeptibilität und Pathogenese bezüglich von Erkrankungshäufigkeit von und Verlauf der Malaria war daher von großem Interesse.

2.3.1 Einfluss von TLR-SNPs auf Atherosklerose

Eigene Arbeit:

Hamann L., Gomma A., Schroder N.W.J., Stamme C., Glaeser C., Schulz S., Gross M., Anker S.D., Fox K., and Schumann R.R. A frequent Toll-like receptor (TLR)-2 polymorphism is a risk factor for coronary restenosis. 2005. J. Mol. Med, 83, 478-485.

Einleitung

Verschiedene Risikofaktoren wie z. B. Rauchen, mangelnde körperliche Fitness und fettreiche Ernährung sind für die Entstehung koronarer Herzerkrankungen beschrieben¹⁰¹, allerdings gab es in den letzten Jahren vermehrt Hinweise für genetische Risikofaktoren¹⁰². Die primären Ursachen für koronare Herzerkrankungen werden kontrovers diskutiert:

Oxidiertes oder enzymatisch verändertes LDL ist als ein wesentlicher Auslöser für koronare Herzerkrankung seit langem akzeptiert¹⁰³, auf der anderen Seite werden chronisch entzündliche Prozesse als wesentliche Ursache diskutiert¹⁰⁴. Insbesondere chronische Infektionen mit *C. pneumoniae* und dem Cytomegalovirus scheinen in die Pathogenese von koronaren Herzerkrankungen involviert zu sein¹⁰⁵. Es war bekannt, dass die beiden TLR-4 Polymorphismen einen schützenden Effekt in Bezug auf die Atherogenese darstellen⁸⁵. Weiterhin war bekannt, dass *C. pneumoniae* Immunzellen über TLR-2 und -4 aktiviert¹⁰⁶⁻¹⁰⁸, während das Cytomegalovirus Zellaktivierung via TLR-9 auslöst^{109, 110}. Neben der Pathogenese sind die ursächlichen Mechanismen der Restenose nach erfolgreicher perkutaner transluminaler coronarer Angioplasty (PTCA) von erheblichem Interesse. Die Restenoserate (definiert als 50% Volumenverlust 6 Monate nach erfolgreicher PTCA) beträgt zwischen 32 - 57 % und stellt ein erhebliches therapeutisches Problem dar^{111, 112}. Die Einführung eines coronaren "stents" nach erfolgreicher PTCA hat die Restenoserate zwar auf 10 - 40 % gesenkt¹¹³, aber die Frage nach den Mechanismen und den Risikofaktoren der Restenose ist bis heute nicht ausreichend beantwortet.

Ziel der hier dargelegten Arbeiten war es daher die bekannten Daten anhand einer größeren Patientenpopulation zu verifizieren, und den Einfluss von häufigen TLR-Polymorphismen auf die Pathogenese der Atherosklerose mit einzubeziehen. Desweiteren sollte untersucht werden, ob TLR-Polymorphismen ein Risiko für die Restenose darstellen.

Zusammenfassung

Es konnten die zuvor publizierten Ergebnisse bezüglich TLR-4 im Trend (jedoch nicht signifikant) bestätigt werden: Die beiden TLR-4 Polymorphismen scheinen einen schützenden Effekt bezüglich der Atherogenese auszuüben, was aber noch durch weitere Studien verifiziert werden muss. Weiterhin wurde gezeigt, dass der untersuchte TLR-2 Polymorphismus zwar nicht mit der Entstehung von Atherosklerose korreliert, aber ein deutlicher Risikofaktor für eine Restenose nach PTCA-Behandlung ist. Es ist zu vermuten, dass ein funktioneller TLR-2, und somit eine limitierte Entzündungsreaktion für eine schnelle Wundheilung nach erfolgreicher PTCA hilfreich ist. In dem hier untersuchten Patientenkollektiv war zudem das Restenoserisiko bei weiblichen TLR-2-Polymorphismusträgern deutlich höher als bei männlichen.

2.3.2 Einfluss von TLR-SNPs auf Malaria

Eigene Arbeit:

*Mockenhaupt F.P., *Cramer J.P., *Hamann L., Stegemann M., Eckert J., Oh N., Otchwemah R.N., Dietz E., Ehrhard S., Schroder N.W.J., Bienzle U., and Schumann R.R. Toll-like receptor polymorphisms in african children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. 2005. Proc. Natl. Acad. Sci., in press.

*: geteilte Erstautorenschaft

Einleitung

Malaria ist eine der häufigsten Infektionserkrankungen. Jährlich infizieren sich ca. 300 - 500 Millionen Menschen mit *Plasmodium falciparum* weltweit, von denen aber nur 1-2 % eine schwere Malaria entwickeln⁹⁵. Für die individuellen Unterschiede bezüglich Suszeptibilität und Manifestation der Malaria werden im wesentlichen genetische Variationen des Wirts verantwortlich gemacht¹¹⁴. Neben den klassischen schützenden Varianten im Hemoglobin-Lokus und der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase spielen auch SNPs in den Genen für die iNOS, den Interferonrezeptor, TNF- α , MBL, und CD36 eine entscheidende Rolle bezüglich der Malaria-Pathogenese^{96, 97, 115-117}. Kürzlich konnte gezeigt werden, das TLR-2 und -4 die Erkennung von *Plasmodium falciparim* Glycophosphatidylinositol¹⁰⁰, bzw. TLR-9 die Erkennung des Hemoglobin-Abbauprodukts Hemozoin gewährleisten¹¹⁸. Bezüglich der entsprechenden Polymorphismen und der Malaria-Pathogenese waren noch keine Daten publiziert. Ziel der Arbeit war es den Einfluss der häufigen TLR-2, -4, -9 Polymorphismen auf die Suszeptibilität und Manifestation von Malaria zu untersuchen.

Zusammenfassung

In der hier dargelegten Arbeit konnte anhand einer Fall/Kontoll-Studie gezeigt werden, dass die TLR-4 SNPs (Arg299Gly und Thr399Ile) Risikofaktoren für schwere Malariaverläufe bei Kindern aus Ghana darstellen. Es wurden 290 gesunde Kinder, 290 asymptomatische aber parasitämische Kinder und 290 Kinder mit schwerer Malaria genotypisiert. Einen Einfluss auf die Suszeptibilität scheint für keinen der gemessenen SNPs zu bestehen, da keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den asymptomatischen parastämischen Kindern gefunden wurden. Bezüglich der beiden TLR-4 SNPs konnte eine

signifikante Erhöhung der Allelfrequenz zwischen der Kontrollgruppe und den Kindern mit schwerer Malaria gemessen werden. Interessanterweise scheinen diese SNPs aber vor dem tödlichen Ausgang der Malaria zu schützen. Aufgrund der geringen Fallzahl erreicht diese Aussage aber kein signifikantes Niveau. Vorrausgesetzt, dass die TLR-4 SNPs einerseits Risikofaktoren für schwere Malaria sind und auf der anderen Seite vor dem tödlichen Ausgang der Malaria schützen, könnte dies eine Erklärung für die ebenfalls gefundene, im Vergleich zu europäischen und amerikanischen Populationen, sehr hohe Allelfrequenz des Asp299Gly SNP von ca. 10% in der ghanaischen Bevölkerung sein. Der TLR-2 SNP wurde in der gesamten Population nicht gefunden, woraus aber nicht ableitet werden kann, dass TLR-2 nicht in die Immunreaktion gegen *Plasmodium falciparum* involviert ist. Die beiden untersuchten TLR-9 SNPs zeigten keine Korrelation mit der Pathogenese oder Manifestation der Malaria.

3 Diskussion

3.1 Zusammensetzung des LPS-Rezeptorkomplexes

LPS ist einer der stärksten Immunaktivatoren der bakteriellen Zellwand. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die Aktivierung von Monozyten/Makrophagen durch membranständiges CD14 (mCD14), bzw. im Fall von Endothelzellen, durch lösliches CD14 (sCD14), vermittelt wird, wobei die Bindung von LPS an CD14 durch LBP katalysiert wird²⁸. Da CD14 ein Glycophosphatidyl-verankertes Oberflächenprotein ist, und somit nicht das signaltransduzierende Molekül sein kann, wurde lange Zeit nach einem transmembranären Molekül gesucht, das für die Zellaktivierung verantwortlich ist. Im Rahmen dieser Fragestellung wurde ein Ligand-Blotting-Assay etabliert, mit dem aus solubilisierten Zellmembranen LPS-bindende Moleküle isoliert wurden. Es wurde ein ca. 80 kDa LPS bindendes Protein isoliert, welches als "Decay Acceleration Factor" (CD55) identifiziert wurde. Die Bindung von LPS an CD55 war abhängig von der Anwesenheit von LBP und sCD14, was die physiologische Relevanz des Assays unterstrich. In Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass CD55, in gleicher Weise wie CD14, die LPS-induzierte Translokation von NF κ B in CHO Zellen deutlich erhöht. Weitere eigene Arbeiten zeigten, dass auch die LPS-induzierte Phosphorylierung der MAP Kinasen p38, ERK und JNK über CD55 vermittelt werden kann¹¹⁹. In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass CD55 ebenso wie CD14 die Zellaktivierung durch verschiedene LPS-Chemotypen gewährleistet. CD55 ist ein ubiquitär exprimiertes Oberflächenprotein, welches eine wichtige Rolle im Komplementsystem spielt. Weiterhin ist CD55, ebenso wie CD14, Glycophosphatidyl-verankert und konnte somit nicht der gesuchte Signalüberträger sein, der dann von einer anderen Arbeitsgruppe mit dem TLR-4 Molekül identifiziert wurde³⁰. Nachdem die Toll-like Rezeptoren als zentrale Signalvermittler bei der Zellaktivierung durch verschiedene PAMPs beschrieben waren, folgten eine Reihe von Arbeiten, die zeigten, dass die TLRs im Zentrum eines großen Rezeptorkomplexes stehen. Mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Analysen konnte in eigener Arbeit gezeigt werden, dass CD55, TLR-4 und CD14 nach Bindung von LPS an CD14 auf der Zellmembran colokalisieren¹¹⁹. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass der LPS-induzierte Rezeptorkomplex zusätzlich die β 2-Integrine CD11b/CD18, das Integrin-assoziierte Molekül CD81, den Fc-Rezeptor CD16a und den Scavenger-Rezeptor CD36 umfasst⁴⁰. Die "Heat-Shock" Proteine HSP70 und HSP90, der Chemokinrezeptor CxCR4 und der Wachstumsfaktor GDF5 wurden ebenfalls im LPS-Rezeptorkomplex nachgewiesen^{46, 120}. Die Funktion und der

Mechanismus der Rekrutierung dieser Moleküle in den LPS-Rezeptorkomplex sind zur Zeit noch weitgehend unklar. Klar gezeigt wurde, dass LPS nach Bindung an CD14 an das MD-2 weitergegeben wird und dieser Komplex nach Bindung an TLR-4 die Zellaktivierung auslöst¹²¹. MD-2 ist für die LPS-induzierte Zellaktivierung essentiell und ist an die extrazelluläre Domäne des TLR-4 gebunden^{58, 59}. Die weiter oben genannten Moleküle werden als zusätzliche Transportmoleküle diskutiert, welche evtl. unterschiedliche LPS-Chemotypen an TLR-4 weiterleiten^{120, 122, 123}.

Die β -Integrine CD11/CD18 wurden schon früher als mögliche LPS-Rezeptoren diskutiert¹²⁴. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass CD11C/CD18-negative Makrophagen im Vergleich zu Wildtyp-Makrophagen nach LPS-Stimulation weniger IL-12 p70 freisetzen, obwohl gleiche Mengen TNF- α produziert werden⁴⁵. Die Hypothese, dass unterschiedlich zusammengesetzte Rezeptorkomplexe zur Zellaktivierung durch unterschiedliche PAMPs benötigt werden, wurde für das "macrophage activating lipopeptide 2" (MALP2) von *Mycoplasma pneumoniae* und die Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* kürzlich bestätigt. Beides sind Liganden des TLR-2/TLR-6 Komplexes. Beide Liganden führen zu einer deutlich verminderten TNF- α Ausschüttung in CD36-negativen Mausmakrophagen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren, wohingegen für Zymosan, welches ebenfalls ein TLR2/TLR6 Ligand ist, kein Unterschied detektiert werden konnte⁹¹.

Die Aktivierbarkeit eines spezifischen Rezeptorkomplexes durch einen spezifischen Liganden wird also durch die Zusammensetzung des Rezeptorkomplexes reguliert. Es ist daher möglich, dass auch CD55 für einen spezifischen Liganden eine essentielle Rolle in der Zellaktivierung spielen kann. Abb.5 zeigt die Stellung von CD55 im LPS-Rezeptorkomplex.

3.2 Regulation der Immunantwort durch lösliche PRRs

Neben der Zusammensetzung des Rezeptorkomplexes spielen auch die Serunkonzentrationen der löslichen PRRs eine entscheidende Rolle in der Regulation einer Immunantwort auf spezifische Aktivatoren. Die essentielle Funktion von LBP bei der Zellaktivierung durch geringe Mengen LPS ist seit langem beschrieben^{29, 125}. Weit weniger gut untersucht, ist die Funktion der bis zu zwanzigfach erhöhten Serumspiegel von LBP während der Akutphase-Reaktion^{52, 53}. Es konnte zwar gezeigt werden, dass hohe LBP-Spiegel einen anti-inflammatorischen Effekt aufweisen und die Zellaktivierung durch LPS

inhibieren, der Mechanismus dieses Effektes war aber unklar^{54, 55}. In den hier dargelegten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass mindestens zwei verschiedene Mechanismen für die

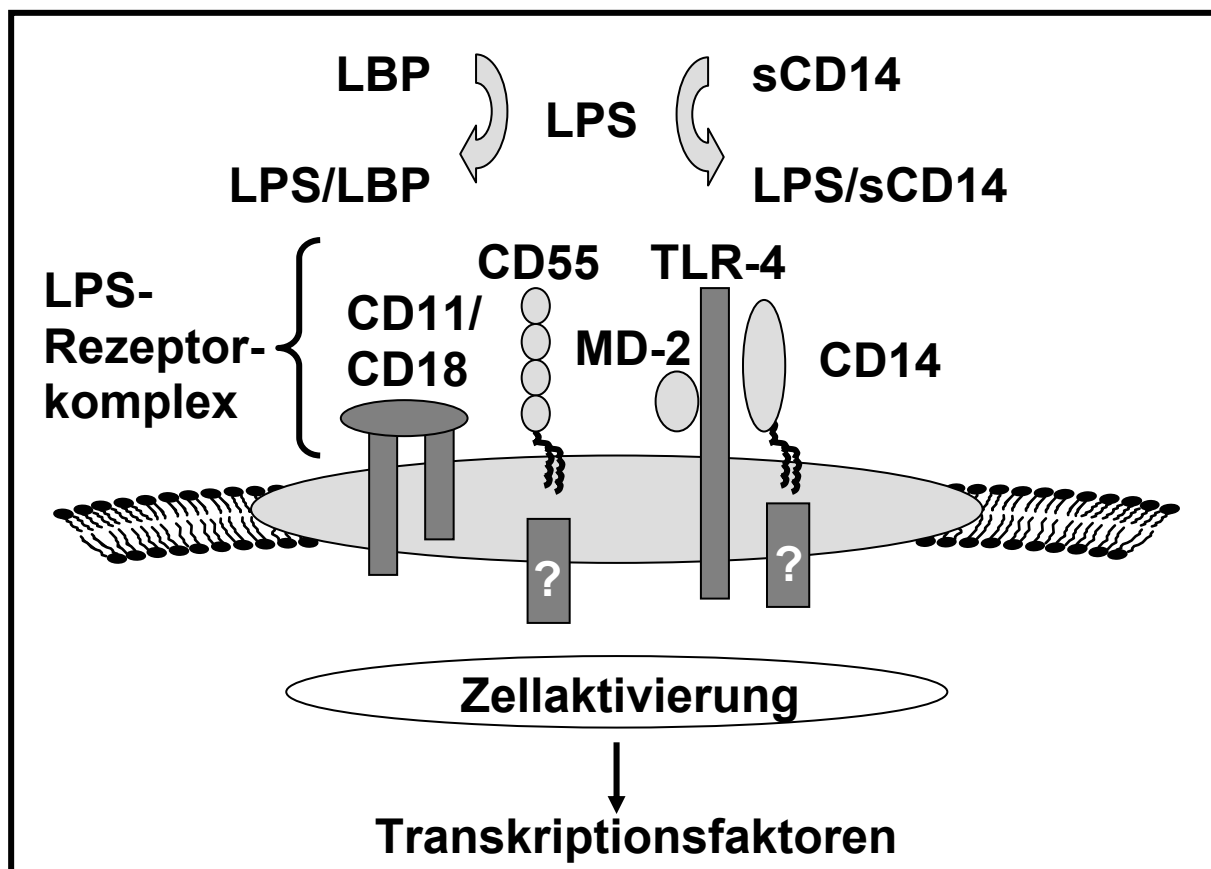


Abb. 5: Potentielle Zusammensetzung des durch LPS-Bindung rekrutierten LPS-Rezeptorkomplexes. LPS: Lipopolysaccharid, LBP: LPS-bindendes Protein, TLR-4: Toll-like receptor-4, sCD14: lösliches CD14.

anti-inflammatorischen Effekte von hohen LBP-Spiegeln verantwortlich sind: Kurzkettiges LPS ("rough-LPS", Re-LPS) wird in Gegenwart von hohen LBP-Spiegeln zwar verstärkt von Zellen aufgenommen, dies führt aber nicht zur Zellaktivierung. Es handelt sich hierbei vermutlich um eine „stille“ LPS-Aufnahme, die über eine Deazetylierung zur Detoxifizierung von LPS führt¹²⁶. Langkettiges LPS ("smooth-LPS", S-LPS) wird durch hohe LBP-Spiegel vermehrt an Serumproteine wie z.B. HDL transportiert und somit der Detoxifizierung über die Leber und die Galle zugeführt¹²⁷. Die LBP-vermittelte Bindung von LPS an HDL ist zwar beschrieben¹²⁸, hier konnte aber erstmals gezeigt werden, dass dieser Prozess präferentiell in Gegenwart von hohen LBP-Spiegeln abläuft, während niedrige LBP-Konzentrationen dazu

führen, dass LPS präferentiell dem zellulären Rezeptorkomplex zugeführt wird. Beide Mechanismen sind zum Teil CD14-unabhängig. Ähnliche Resultate wurden auch von Gioannini et al. publiziert^{129, 130}. In diesen Arbeiten wurde zusätzlich noch gezeigt, dass weder LBP/LPS- noch CD14/LPS-Komplexe in der Lage sind TLR-4 positive Zellen zu stimulieren. Zellaktivierung wird nur durch MD-2/LPS Komplexe vermittelt. LBP und CD14 sind dabei lediglich Transportproteine, die LPS mit hoher Sensitivität binden und auf MD-2 übertragen, welches dann mit LPS komplexiert TLR-4 aktiviert. Für diesen sequentiellen Transfer von LPS vom LBP über CD14 an MD-2 sind LPS/Protein-Komplexe mit einem stoichiometrisch geringen Proteinanteil Voraussetzung¹³⁰. Diese Kaskade wird nach den hier dargelegten Arbeiten durch hohe LBP-Konzentrationen unterbunden, da der Transfer von LPS an CD14 blockiert wird. Es ist zu vermuten, dass hohe CD14 Konzentrationen aus dem gleichen Grund anti-inflammatorisch wirken⁵⁰.

Neben den hier beschriebenen Unterschieden in den Detoxifizierungsmechanismen bezüglich LPS-Chemotypen mit unterschiedlich langen Zuckerketten sind auch Unterschiede in der Wirt/Pathogen-Interaktion in Bezug auf die Kettenlänge des LPS in der Literatur beschrieben worden. *Gram*-negative Bakterien, welche lange LPS-Chemotypen exprimieren, scheinen besser vor dem Angriff des Komplementsystems geschützt zu sein als Bakterien mit kurzkettigen LPS¹³¹. Auch die antibakterielle Aktivität von neutrophilen Granulozyten wird durch langkettiges LPS vermindert¹³². Bei der Besiedlung des Darms durch verschiedene *Salmonella* Isolate konnte gezeigt werden, dass diejenigen Isolate, die ein langkettiges LPS exprimieren, einen Selektionsvorteil gegenüber Isolaten, die kurzkettiges LPS exprimieren, aufweisen¹³³.

Ergebnisse weiterer eigener Arbeiten waren die Befunde, dass LBP auch in die Signalvermittlung durch andere PAMPs involviert ist. Physiologische Konzentrationen von LBP katalysieren sowohl die Bindung von Tri- und Diacetylierten Lipopeptiden als auch die von Lipoteichonsäuren, isoliert aus *Streptococcus pneumoniae* und *Staphylococcus aureus*, an CD14. Im Falle der Lipoteichonsäure konnte gezeigt werden, dass ebenso wie bei LPS hohe LBP-Konzentrationen die Bindung von LTA an CD14 inhibieren und anti-inflammatorische Effekte haben^{42, 134}. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Steigerung der LBP-Konzentrationen bis hin zu den Akut-Phase-Konzentrationen die Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Eigenschaften des LBP zu Gunsten der anti-inflammatorischen Effekte verschiebt. In Abb.6 sind die Mechanismen der pro- und anti-inflammatorischen Effekte von unterschiedlichen LBP-Konzentrationen zusammenfassend dargestellt.

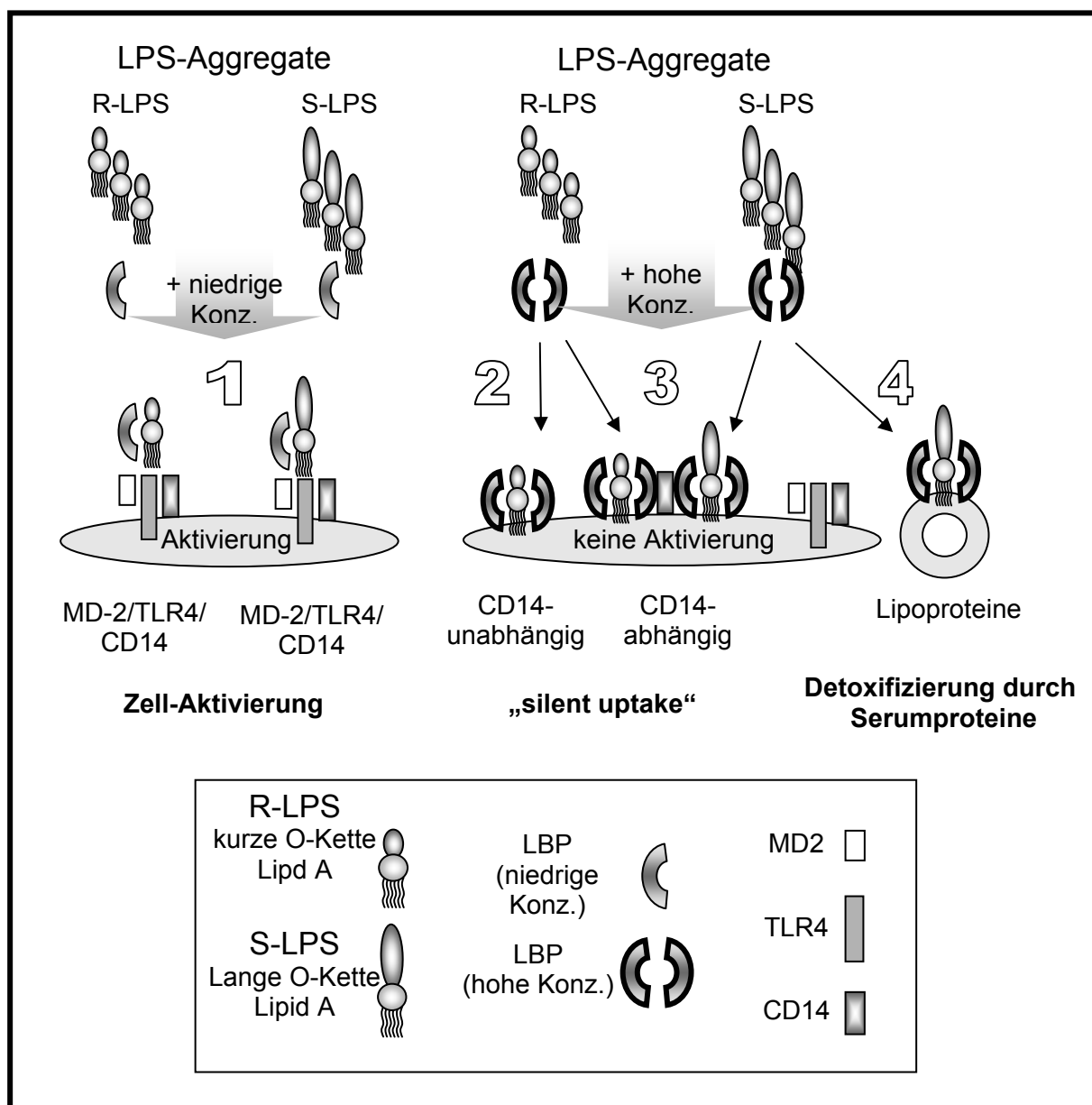


Abb. 6: Mechanismen zu den Pro- und anti-inflammatorischen Effekten von verschiedenen LBP-Konzentrationen. Katalyse der Zellaktivierung bei niedrigen LBP-Konzentrationen (1). Inhibition der Zellaktivierung durch stillen LPS-uptake unter hohen LBP-Konzentrationen, CD14 unabhängig und CD14 abhängig (2,3). Inhibition der Zellaktivierung unter hohen LBP-Konzentrationen durch präferentiellen Transport von LPS an Serumproteine. LPS: Lipopolysaccharid, R-LPS: rough (kurzkettiges) LPS, S-LPS: smooth (langkettiges) LPS, TLR4: Toll-like receptor-4, O-Kette: Zuckerkette.

Eine konzentrationsabhängige Beeinflussung der LPS-induzierten Immunantwort konnte in weiteren eigenen Arbeiten auch für einen weiteren löslichen PRR, das Surfactant

Protein A (SP-A), nachgewiesen werden. Das pulmonale Surfactant-Protein A (SP-A) ist das prominenteste Surfactant-Protein der Lunge und hat immunmodulatorische Eigenschaften¹³⁵. Die veränderte Immunreaktion von SP-A-defizienten Mäusen auf verschiedene Pathogene lässt auf eine anti-inflammatorische Funktion von SP-A *in vivo* schließen¹³⁶. In eigenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass SP-A die Bindung von LPS an LBP inhibiert und somit die LPS-Transferkaskade an den Rezeptorkomplex am ersten Schritt unterbricht. Dieser Effekt kann *in vitro* durch hohe Serumkonzentrationen blockiert werden und ist abhängig von der Vorinkubation von SP-A mit LPS oder von einem großen Überschuss an SP-A. Bei gleichzeitiger Gabe von SP-A und LBP wird die LPS-induzierte Zellaktivierung nicht inhibiert, was auf die deutlich höhere Affinität von LBP zum LPS im Vergleich zum SP-A zurückzuführen ist¹³⁷. Unter physiologischen Bedingungen beträgt die Konzentration von SP-A in der Alveolarflüssigkeit 200 bis 500 µg/ml, diese Konzentrationen sinken dann jedoch drastisch unter pathologischen Bedingungen¹³⁸. Die Konzentration von LBP verhält sich exakt entgegengesetzt: Unter physiologischen Bedingungen liegt die LBP-Konzentration der Alveolarflüssigkeit zwischen 10 und 100 ng/ml und steigt unter pathologischen Bedingungen auf das 100-fache an¹³⁹. Es ist somit zu vermuten, dass SP-A unter physiologischen Bedingungen einen anti-inflammatorischen Effekt hat, der unter pathophysiologischen Bedingungen durch das veränderte SP-A/LBP Verhältnis aufgehoben wird. Ein weiterer anti-inflammatorischer Mechanismus, der auf Ebene der Interaktion von LPS mit der Zielzelle wirkt, ist, in Analogie zu hohen LBP-Konzentrationen, die durch SP-A verstärkte CD14-unabhängige stille Aufnahme von LPS¹³⁷.

3.3 TLR-SNPs und inflammatorische Erkrankungen

Durch die zentrale Rolle der TLRs bei der Initiierung einer angeborenen sowie einer adaptiven Immunantwort gegen eine Vielzahl von Pathogenen^{10, 20} sind im Zeitalter der "functional genomics" "single nucleotide polymorphisms" (SNPs) der TLRs in Bezug auf Krankheits-Suszeptibilität von großem Interesse¹⁴⁰. SNPs in den TLR-Genen könnten zu einer verminderten oder dysregulierten Immunantwort, und somit erhöhter Suszeptibilität für inflammatorische Krankheiten führen. Die initiale Arbeit zu den häufigen TLR-4 SNPs zeigte eine signifikant reduzierte Immunreaktion auf inhaliertes LPS bei Probanden, die Träger des Asp299Gly- oder Thr399Ile-SNP im TLR-4 Gen waren⁸². Einige kleine Studien konnten eine positive Korrelation dieser SNPs und Infektionen durch *Gram*-negative Bakterien zeigen^{86, 87, 141}. Andererseits konnten große Studien keinen Einfluss dieser SNPs auf die Suszeptibilität

von Meningokokkeninfektionen zeigen^{142, 143}. In einer eigenen Arbeit konnte, aufgrund der niedrigen Fallzahlen lediglich im Trend, nicht aber signifikant, eine positive Korrelation der TLR-4 SNPs mit postoperativen septischen Komplikationen gefunden werden¹⁴⁴. Hierauf folgten eine Reihe von Arbeiten mit widersprüchlichen Ergebnissen, die den Einfluss dieser SNPs auf klassische Infektionskrankheiten und auf chronisch entzündliche Herzerkrankungen untersuchten. Bezüglich der chronisch-entzündlichen Herzerkrankungen sind die Daten ebenfalls widersprüchlich. Mehrere Studien konnten einen schützenden Effekt der TLR-4-SNPs in Bezug auf Atherosklerose und dem akuten Myokardinfarkt zeigen^{85, 145, 146}, wohingegen eine andere große Arbeit keine signifikante Korrelation fand¹⁴⁷. Bezüglich des TLR-2 ist ein SNP Arg753Gln beschrieben worden, der mit einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber *Staphylococcus aureus*-Infektionen in Verbindung gebracht wurde⁸³. Desweiteren wurden zwei Promotor Polymorphismen des TLR-9 Gens beschrieben, welche mit einem erhöhten Risiko für Asthma assoziiert sind⁷⁹.

Das Problem der meisten Studien war jedoch die geringe Probandenzahl. Um größere Patientenkollektive zu untersuchen wurden in eigenen Arbeiten geeignete Analysemethoden für den mittleren Durchsatz etabliert und diese dann für eigene Fall/Kontroll-Studien genutzt^{148, 149}.

Bezüglich der Entstehung von koronaren Herzerkrankungen sind verschiedene Umwelteinflüsse wie z. B. Rauchen, mangelnde körperliche Fitness und fettreiche Ernährung beschrieben worden¹⁰¹, allerdings gibt es auch Hinweise für genetische Risikofaktoren¹⁰². Neben Störungen des Fettstoffwechsels, die als Ursacher von koronaren Herzerkrankungen seit langem akzeptiert sind¹⁰³, werden auch chronisch-entzündliche Prozesse als wesentliche Ursache diskutiert¹⁰⁴. Hierbei scheinen besonders chronische Infektionen mit *C. pneumoniae* und dem Cytomegalovirus (CMV) eine Rolle zu spielen¹⁰⁵. Als Mediatoren der Zellaktivierung durch *C. pneumoniae* und CMV waren die TLRs 2 und 4¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ bzw. 9 bekannt^{109, 110}. Um einen Zusammenhang von TLR-Polymorphismen und Atherosklerose zu untersuchen, wurden zwei Populationen von Patienten mit symptomatischen koronaren Herzerkrankungen (KHK), welche eine perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA) erhielten, bezüglich der drei beschriebenen SNPs in den TLR-2 und TLR-4 Genen genotypisiert. Der zuvor publizierte Befund, dass die TLR-4 Polymorphismen seltener bei KHK-Patienten vorkommen und somit einen Schutz vor Atherosklerose darstellen, konnte als Trend, nicht aber auf signifikantem Niveau bestätigt werden. Die Hypothese eines schützenden Effekts des TLR-4-Polymorphismus bezüglich der Atherosklerose konnte

kürzlich mit Hilfe eines Mausmodells unterstützt werden. Knock-out Tiere sowohl für TLR-4 als auch für MyD88, einen essentiellen Mediator der TLR-4 vermittelten Zellaktivierung, zeigten eine signifikant verlangsamte Entwicklung von Atherosklerose^{150, 151}. Die Allelfrequenz des TLR-2 SNPs zeigte keinen Unterschied zwischen den Kontrollen und den Patienten.

Ein Hauptproblem bei der PTCA ist die koronare Restenose die bei 32-57 % der Patienten nach ca. 6 Monaten auftritt und auch bei Einführung eines Stents noch eine Häufigkeit von 10-40 % aufweist¹¹³. Es konnte durch unsere Arbeiten gezeigt werden, dass das Risiko einer Restenose, unabhängig von der Implantation eines Stents, signifikant mit dem Auftreten des TLR-2 Polymorphismus Arg753Gln korreliert. Diese positive Korrelation ist bei weiblichen Patienten deutlich stärker ausgeprägt als bei männlichen Patienten. Der TLR-4 Polymorphismus Asp299Gly korreliert nach den hier gezeigten Daten hingegen nicht mit einem erhöhten Risiko einer Restenose. Hieraus ist zu schließen, dass unterschiedliche genetische Risikofaktoren in den chronischen Prozess der Atherogenese auf der einen und den akuten Prozess der Restenose auf der anderen Seite involviert sind. Kürzlich konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine TLR-vermittelte Entzündungsreaktion essentiell für die Wundheilung nach einer chemisch induzierten Colitis ist¹⁵². Eine verminderte oder dysregulierte Entzündungsreaktion durch einen defekten TLR-2 könnte somit zu einer verlangsamten Wundheilung mit nachfolgender Restenose führen. In einer weiteren eigenen Arbeit wurde dieses Probandenkollektiv bezüglich der beiden TLR-9 Promotor SNPs untersucht. Es konnte aber kein Einfluss dieser SNPs auf die Entstehung von Atherosklerose bzw. auf die Pathogenese nach PTCA gefunden werden¹⁵³. In Abb. 7 sind die möglichen Mechanismen zum Einfluss der TLR-2/4 SNPs auf die koronare Herzerkrankung schematisch dargestellt.

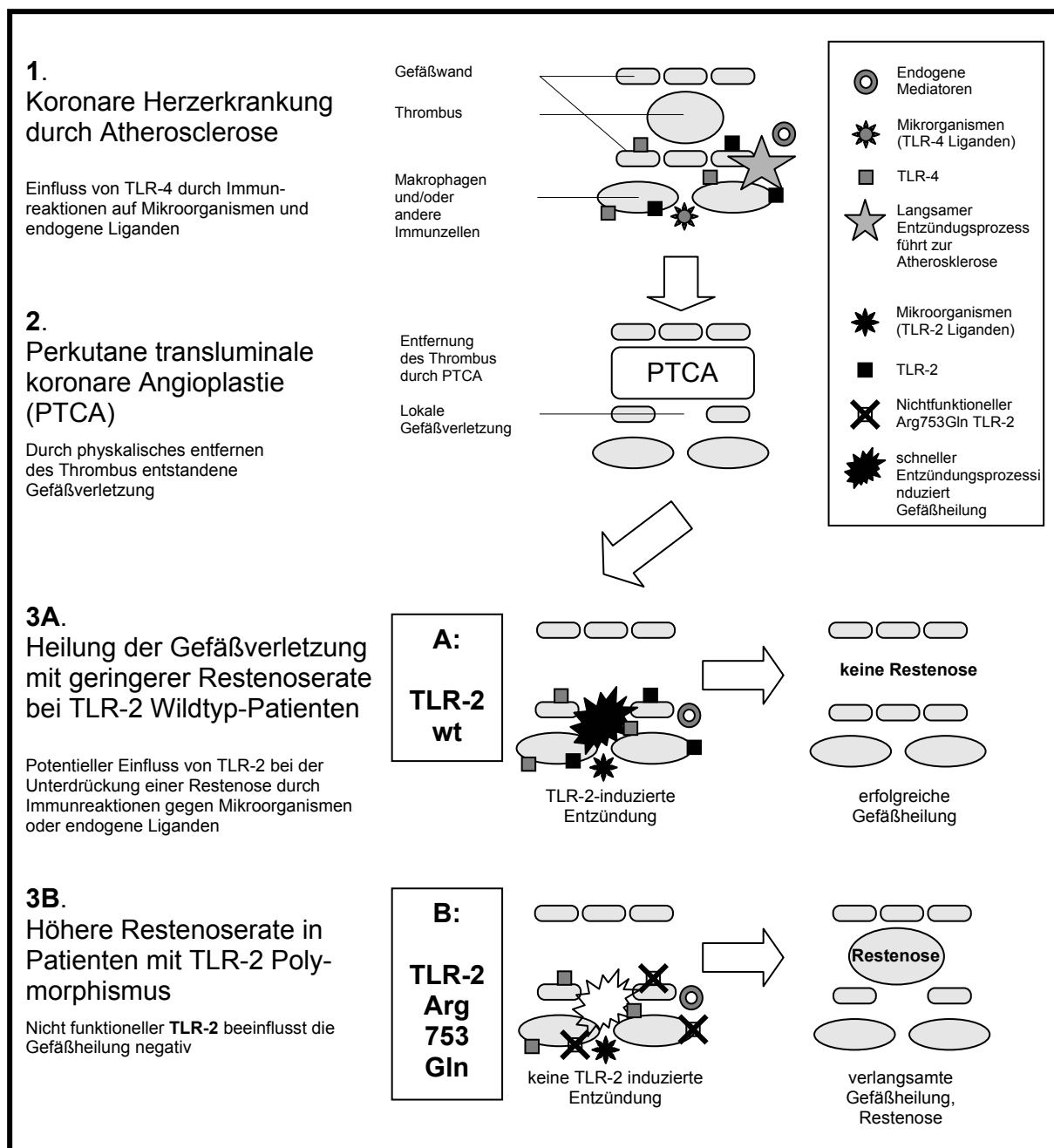


Abb.7: Hypothese zum Einfluss von TLR-2/-4 auf die koronare Herzerkrankung. Die zuvor publizierten Daten welche einen schützenden Effekt der TLR-4 SNPs auf die Atherogenese postulieren konnten im Trend bestätigt werden. Eine verminderte Pathogen-Erkennung durch den mutierten TLR-4 scheint diesem Prozess entgegen zu wirken (1). Heilung von lokalen Gefäßschädigungen nach PTCA (2) benötigt einen funktionellen TLR-2 (3A). Eine verminderte inflammatorische Reaktion führt zu einem vermehrten Auftreten einer Restenose nach PTCA. TLR: toll-like receptor, Arg: Arginin, Gln: Glutamin, wt: wildtyp. PTCA: perkutane transluminale Angioplastie.

Malaria ist mit 300 - 500 Millionen Infizierten pro Jahr eine der wichtigsten Infektionskrankheiten. Nur 1 - 2 % der Erkrankten entwickeln eine schwere Malaria mit oft tödlichem Ausgang⁹⁵. Die unterschiedlichen Verläufe der Erkrankung werden im wesentlichen durch die Immunreaktion des Wirts beeinflusst. Die Regulation der Immunantwort gegenüber *P. falciparum* Infektionen ist allerdings komplex und bisher kaum verstanden. Einen klassischen Immunstatus, wie er gegenüber viralen oder bakteriellen Infektionen möglich ist, gibt es bei *P. falciparum*-Infektionen nicht. In Gebieten, in denen Malaria endemisch ist, kann sich eine Semi-Immunität entwickeln¹⁵⁴. In diesem Fall wird zwischen einer sich gegen parasitäre Toxine richtenden - "klinischen" - und einer sich gegen den Parasiten richtenden - "parasitären" - Immunität unterschieden¹⁵⁵. Das durch lysierte Parasiten freigesetzte Glycophosphatidylinositol (GPI) scheint dabei ein wichtiger Aktivator des Immunsystems zu sein, der dazu führt, dass es, ähnlich wie in der bakteriellen Sepsis, durch die resultierende überschießende Freisetzung von TNF- α zur Manifestation einer schweren Malaria kommt¹⁵⁶. Eine balancierte Immunantwort, die in der Lage ist, die Parasitenlast zu minimieren ohne durch massive Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine die Manifestation einer schweren Malaria zu fördern, ist Voraussetzung für einen semi-immunen Status. Die Rolle des angeborenen Immunsystems ist hierbei noch kaum untersucht¹⁵⁷.

Genetische Variationen des Wirts haben großen Einfluss auf die Manifestation einer schweren Malaria^{114, 158}. Eine Vielzahl von schützenden Genvarianten, z. B. im Hemoglobin Locus, sind beschrieben worden^{96, 97, 115-117}. Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, welche *P. falciparum*-spezifische Moleküle binden, sind zum Beispiel CD36 und MBL^{159, 160}. Eine eingeschränkte Immunantwort nach einer *P. falciparum* Infektion durch Mutationen in diesen Genen führt zu einem erhöhten Risiko für schwere Malaria-Verläufe^{96, 97}. Als möglicher TLR-Ligand wurde kürzlich das *P. falciparum*-GPI beschrieben¹⁰⁰. Weiterhin wurde gezeigt, dass das Abbauprodukt des Hemoglobin, das Hemozoin, welches nach der Lyse infizierter Erythrozyten freigesetzt wird, durch TLR-9 erkannt wird¹¹⁸.

In der hier gezeigten Arbeit ergab sich eine signifikant erhöhte Allelfrequenz für beide TLR-4 SNPs in der Gruppe mit schwerer Malaria im Vergleich zur Kontrollgruppe. Somit sind diese SNPs Risikofaktoren für schwere Malaria-Verläufe. Ein signifikanter Einfluss auf die Suszeptibilität konnte nicht nachgewiesen werden. Weiterhin geht aus den Daten hervor, dass die TLR-4-SNPs protektiv gegenüber dem tödlichen Ausgang einer schweren Malaria sind. Aufgrund der geringen Fallzahl erreicht diese Aussage aber kein signifikantes Niveau. Eine ineffiziente Erkennung des *P. falciparum* GPI durch den mutierten TLR-4 könnte zu einer

verminderten Antwort des angeboren Immunsystems am Krankheitsbeginn oder zu einer verminderten adaptiven Immunantwort im Laufe der Krankheit führen und somit schwere Malaria Verläufe begünstigen. Die allgemein hohe Allelfrequenz von ca. 10 % des TLR-4 Asp299Gly SNPs in Afrika im Vergleich zu ca. 6 % in Europa steht im gewissen Widerspruch zu der These, dass dieser SNP ein Risikofaktor für eine in Afrika endemische Erkrankung ist. Durch den anhaltenden Selektionsdruck sollte die Allelfrequenz gerade dieses SNPs verringert sein. Allerdings wurde dieses Phänomen auch für andere Malaria-Risikofaktoren, z. B. SNPs im CD36-Gen, gefunden⁹⁶. Eine Erklärung könnte ein bisher unbekannter positiver Selektionsdruck sein. Bezüglich des TLR-4 SNP konnte gezeigt werden, dass trotz des erhöhten Risikos für schwere Malaria ein gewisser, wenn auch nicht signifikanter, Schutz in Bezug auf den tödlichen Ausgang der schweren Malaria besteht, was die hohen Allelfrequenzen ebenfalls erklären könnte.

Der TLR-2 SNP wurde in der gesamten Population nicht gefunden, woraus man aber nicht ableiten kann, dass der TLR-2 Rezeptor nicht in die Immunreaktion gegen *Plasmodium falciparum* involviert ist. Für die beiden TLR-9 Promotor SNPs konnten keine Assoziationen gefunden werden.

4 Zusammenfassung

Die vorgestellten Arbeiten beschäftigen sich mit drei Aspekten der Regulation der angeborenen Immunantwort auf mikrobielle Zellwandbestandteile.

1. Zusammensetzung des LPS-Rezeptorkomplexes
2. Regulation der Immunantwort durch lösliche PRRs
3. TLR SNPs als Risikofaktoren für inflammatorische Erkrankungen

Die Toll-like Rezeptoren (TLR) sind die zentralen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems. Sie sind jeweils in der Lage eine Vielzahl von "Pathogen associated molecular pattern" (PAMPs) zu erkennen und rekrutieren im Zuge dieser Erkennung eine Vielzahl von assoziierten Proteinen zu einem multifunktionellen Rezeptorkomplex. Die Zusammensetzung dieses Komplexes variiert je nach Ligand, ist aber im Einzelnen bisher nicht exakt beschrieben worden. Bekannt ist jedoch, dass die spezielle Zusammensetzung des Rezeptorkomplexes das Muster der induzierten Immunantworten beeinflusst.

Es konnte hier gezeigt werden, dass CD55 Teil des LPS-induzierten LPS-Rezeptorkomplexes auf humanen Monozyten ist. Transfektion von CD55 in CHO-Zellen führt, ähnlich wie die Transfektion des LPS-Rezeptors CD14, zu einer deutlichen Steigerung der Sensitivität gegenüber LPS. CHO/CD55-Zellen zeigen nach LPS-Stimulation das gleiche Aktivitätsmuster wie CHO/CD14-Zellen. Die Signalwege von NF κ B sowie der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK werden in beiden Fällen aktiviert, allerdings in CD55/CHO-Zellen etwas weniger sensitiv. Somit scheint CD55 neben seiner Funktion im Komplementsystem eine weitere Funktion in der LPS-induzierten Zellaktivierung zu haben.

Die Bindung der Liganden an den Rezeptorkomplex wird im wesentlichen durch lösliche PRRs katalysiert. Bezüglich der Bindung von LPS an TLR-4 spielt das LPS-bindungs Protein (LBP) und in der Lunge auch das Surfactant Protein A (SP-A) eine zentrale Rolle. Seit Langem beschrieben ist, dass physiologische Konzentrationen (5-10 μ g/ml) von LBP in der Lage sind, LPS-Monomere aus LPS-Aggregaten herauszulösen, die LPS-Bindung an CD14 zu katalysieren, und somit die Transferkaskade von LPS zum TLR-4 zu initiieren. Hohe LBP-Konzentrationen von bis zu 200 μ g/ml werden in der Akut-Phase erreicht und haben bezüglich einer LPS-induzierten Zellaktivierung einen inhibitorischen Effekt. Mechanistisch war der inhibitorische Effekt bisher nicht untersucht. In den vorliegenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Inhibition durch hohe LBP-Konzentrationen durch die Hemmung

des Transfers vom LBP zum CD14 erfolgt, wodurch die Transferkaskade vom LBP über CD14 und MD-2 zum TLR-4 unterbrochen wird. Weiterhin wurde gezeigt, dass hohe LBP-Konzentrationen unterschiedliche LPS-Chemotypen auf verschiedene Weise transferieren. Langkettiges LPS (S-Form LPS) wird präferentiell an Serumproteine wie z. B. das HDL übertragen und somit der Detoxifizierung über Leber und Galle zugeführt. Kurzkettiges LPS (R-Form LPS) hingegen wird einer "stillen" Aufnahme durch Zellen zugeführt und über diesen Weg detoxifiziert. Ob für diese "stille" Aufnahme ein weiterer zellulärer Rezeptor nötig ist oder ob der LBP/LPS-Komplex direkt von der Zelle aufgenommen wird, bleibt zu klären. Der in der Literatur beschriebene Einfluss der LPS-Kettenlänge auf die Pathogenese verschiedener Bakterienespezies konnte also auch für die Detoxifizierungsmechanismen gezeigt werden.

Für das pulmonale Surfactant Protein A (SP-A) war eine anti-inflammatorische *in vivo* Wirkung gezeigt. Die in eigenen Arbeiten dargelegten Daten zeigen das SP-A die Bindung von LPS an LBP inhibiert und somit den Transfer von LPS zum TLR-4 blockiert. Dieser Effekt ist von einem starken Überschuss von SP-A im Verhältnis zum LBP abhängig, welcher unter physiologischen Bedingungen in der Lunge gegeben ist.

Aufgrund ihrer zentralen Rolle in der angeborenen und somit auch in der adaptiven Immunität besteht großes Interesse daran, Assoziationen von Polymorphismen der TLR-Rezeptoren mit inflammatorischen Erkrankungen zu untersuchen, da ein Einfluss auf die Regulation der Immunantwort zu erwarten ist. Für die schnelle Genotypisierung der bekannten TLR-Polymorphismen wurde die entsprechende Methodik etabliert. Bezüglich einer Assoziation der bekannten TLR-Polymorphismen mit Atherosklerose konnten die bisher publizierten Daten im Trend bestätigt werden. Die Häufigkeit des TLR-4 Asp299Gly Polymorphismus ist im Trend, nicht aber signifikant, niedriger in Atherosklerosepatienten verglichen mit einer gesunden Kontrollpopulation und scheint daher einen gewissen Schutz vor Atherosklerose zu bieten. Ein interessanter Befund war, dass die Frequenz des TLR-2 Arg753Gln Polymorphismus in PTCA Patienten die eine Restenose entwickelten deutlich erhöht ist und somit ein Risikofaktor für Restenose ist. Im Vergleich zwischen gesunden Kontroll-Probanden und PTCA Patienten, mit und ohne Restenose, ließ sich kein Unterschied feststellen. Diese Daten lassen darauf schließen, dass dem chronischen Prozess der Atherogenese andere Mechanismen zugrunde liegen als dem der akuten inflammatorischen Restenose. Bezüglich der Manifestation einer schweren Malaria konnten die beiden TLR-4 SNPs als signifikante Risikofaktoren identifiziert werden. Ein Einfluss auf die Suszeptibilität von *P. falciparum* Infektionen scheint nicht zu bestehen. Die im Vergleich zu Kaukasiern

hohe Allelfrequenz dieser SNPs in Afrika könnte durch einen schützenden Mechanismus vor einem tödlichen Ausgang schwerer Malariaverläufe erklärt werden.

5 Literatur

1. Dempsey PW, Vaidya SA, Cheng G. The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:2604-21.
2. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002; 296:298-300.
3. Janeway CA, Jr. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:7461-8.
4. Janeway CA, Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992; 13:11-6.
5. Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 2002; 111:927-30.
6. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216.
7. Brack C, Hiramama M, Lenhard-Schuller R, Tonegawa S. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 1978; 15:1-14.
8. Schatz DG, Oettinger MA, Schlissel MS. V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:359-83.
9. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symp Quantit Biol* 1989; 54:1-13.
10. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1:135-45.
11. Medzhitov R, Janeway C, Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 2000; 8:452-6.
12. Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:875-904.
13. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:359-93.
14. Austen KF, Fearon DT. A molecular basis of activation of the alternative pathway of human complement. *Adv Exp Med Biol* 1979; 120B:3-17.
15. Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 2000; 1:119-26.

16. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:984-93.
17. Rietschel ET, Mamat U, Hamann L, et al. Bacterial endotoxins as inducers of septic shock. *Novo Acta Leopoldina* 1999; 307:93-122.
18. Woltmann A, Hamann L, Ulmer AJ, Gerdes J, Bruch HP, Rietschel ET. Molecular mechanisms of sepsis. *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383:2-10.
19. Hamann L, El-Samalouti V, Ulmer AJ, Flad HD, Rietschel ET. Components of gut bacteria as immunomodulators. *Int J Food Microbiol* 1998; 41:141-54.
20. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2:675-80.
21. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:9237-42.
22. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303:1526-9.
23. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413:732-8.
24. Schumann R. Endotoxinerkennung im Wirtsorganismus. Habilitationsschrift 1995.
25. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:169-76.
26. Pfeiffer R. Untersuchung über das Cholera Gift. *Z. Hyg.* 1892; 11:393-411.
27. Luderitz O, Galanos C, Risse HJ, et al. Structural relationship of Salmonella O and R antigens. *Ann N Y Acad Sci* 1966; 133:349-74.
28. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249:1431-3.
29. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 249:1429-31.
30. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282:2085-8.
31. Philpott DJ, Girardin SE. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol Immunol* 2004; 41:1099-108.
32. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1999; 64:429-35.

33. Dunzendorfer S, Lee HK, Soldau K, Tobias PS. Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses. *Faseb J* 2004; 18:1117-9.
34. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004; 5:190-8.
35. Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, et al. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 2003; 171:3154-62.
36. Inohara N, Chamaillard M, McDonald C, Nunez G. NOD-LRR Proteins: Role in Host-Microbial Interactions and Inflammatory Disease. *Annu Rev Biochem* 2004.
37. Ferrero E, Hsieh CL, Francke U, Goyert SM. CD14 is a member of the family of leucine-rich proteins and is encoded by a gene syntenic with multiple receptor genes. *J Immunol* 1990; 145:331-6.
38. Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* 2003; 24:528-33.
39. Carneiro LA, Travassos LH, Philpott DJ. Innate immune recognition of microbes through Nod1 and Nod2: implications for disease. *Microbes Infect* 2004; 6:609-16.
40. Pfeiffer A, Bottcher A, Orso E, et al. Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur J Immunol* 2001; 31:3153-64.
41. Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 1993; 14:121-5.
42. Schroder NW, Morath S, Alexander C, et al. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 2003; 278:15587-94.
43. Heidenreich S. Monocyte CD14: a multifunctional receptor engaged in apoptosis from both sides. *J Leukoc Biol* 1999; 65:737-43.
44. Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 1998; 392:505-9.
45. Perera PY, Mayadas TN, Takeuchi O, et al. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J Immunol* 2001; 166:574-81.

46. Triantafilou K, Triantafilou M, Dedrick RL. A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat Immunol* 2001; 2:338-45.
47. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. Pentraxins at the Crossroads Between Innate Immunity, Inflammation, Matrix Deposition and Female Fertility. *Annu Rev Immunol* 2004.
48. van de Wetering JK, van Golde LM, Batenburg JJ. Collectins: players of the innate immune system. *Eur J Biochem* 2004; 271:1229-49.
49. Frey EA, Miller DS, Jahr TG, et al. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1992; 176:1665-71.
50. Kitchens RL, Thompson PA, Viriyakosol S, O'Keefe GE, Munford RS. Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *J Clin Invest* 2001; 108:485-93.
51. Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:2744-8.
52. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, et al. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 1999; 180:1584-9.
53. Blairon L, Wittebole X, Laterre PF. Lipopolysaccharide-binding protein serum levels in patients with severe sepsis due to gram-positive and fungal infections. *J Infect Dis* 2003; 187:287-91.
54. Zweigner J, Gramm HJ, Singer OC, Wegscheider K, Schumann RR. High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes. *Blood* 2001; 98:3800-8.
55. Lamping N, Dettmer R, Schroder NW, et al. LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *J Clin Invest* 1998; 101:2065-71.
56. Hamann L, Stamme C, Ulmer AJ, Schumann RR. Inhibition of LPS-induced activation of alveolar macrophages by high concentrations of LPS-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 295:553-60.
57. Beamer LJ, Carroll SF, Eisenberg D. The BPI/LBP family of proteins: a structural analysis of conserved regions. *Protein Sci* 1998; 7:906-14.

58. Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *Int Immunopharmacol* 2003; 3:119-28.
59. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189:1777-82.
60. Henneke P, Golenbock DT. Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells. *Crit Care Med* 2002; 30:S207-13.
61. Schromm AB, Lien E, Henneke P, et al. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med* 2001; 194:79-88.
62. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 2002; 3:667-72.
63. Pugin J, Stern-Voefferay S, Daubeuf B, Matthay MA, Elson G, Dunn-Siegrist I. Soluble MD-2 activity in plasma from patients with severe sepsis and septic shock. *Blood* 2004; 104:4071-9.
64. Chang MK, Binder CJ, Torzewski M, Witztum JL. C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:13043-8.
65. Lysenko E, Richards JC, Cox AD, et al. The position of phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* affects binding and sensitivity to C-reactive protein-mediated killing. *Mol Microbiol* 2000; 35:234-45.
66. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive Protein. *J Biol Chem* 2004; 279:48487-90.
67. Bharadwaj D, Mold C, Markham E, Du Clos TW. Serum amyloid P component binds to Fc gamma receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *J Immunol* 2001; 166:6735-41.
68. Wright JR. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:58-68.
69. Gadjeva M, Takahashi K, Thiel S. Mannan-binding lectin--a soluble pattern recognition molecule. *Mol Immunol* 2004; 41:113-21.
70. Chamailard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol* 2003; 5:581-92.
71. Inohara N, Nunez G. The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* 2001; 20:6473-81.

72. Weinrauch Y, Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 1999; 53:155-87.
73. Chamailard M, Hashimoto M, Horie Y, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 2003; 4:702-7.
74. Girardin SE, Travassos LH, Herve M, et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem* 2003; 278:41702-8.
75. Bell J. Predicting disease using genomics. *Nature* 2004; 429:453-6.
76. Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 1988; 318:727-32.
77. Taylor JG, Choi EH, Foster CB, Chanock SJ. Using genetic variation to study human disease. *Trends Mol Med* 2001; 7:507-12.
78. Hill AV. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:593-617.
79. Lazarus R, Vercelli D, Palmer LJ, et al. Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunol Rev* 2002; 190:9-25.
80. Miceli-Richard C, Lesage S, Rybojad M, et al. CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat Genet* 2001; 29:19-20.
81. Hugot JP, Chamailard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:599-603.
82. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25:187-91.
83. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* 2000; 68:6398-401.
84. Hawn TR, Verbon A, Janer M, Zhao LP, Beutler B, Aderem A. Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaires' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:2487-9.
85. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002; 347:185-92.
86. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002; 162:1028-32.

87. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, et al. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002; 186:1522-5.
88. Moore CE, Segal S, Berendt AR, Hill AV, Day NP. Lack of association between Toll-like receptor 2 polymorphisms and susceptibility to severe disease caused by *Staphylococcus aureus*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11:1194-7.
89. Flaherty SF, Golenbock DT, Milham FH, Ingalls RR. CD11/CD18 leukocyte integrins: new signaling receptors for bacterial endotoxin. *J Surg Res* 1997; 73:85-9.
90. Nicholson-Weller A, Wang CE. Structure and function of decay accelerating factor CD55. *J Lab Clin Med* 1994; 123:485-91.
91. Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 2005; 433:523-7.
92. Gegner JA, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance. Dual roles for LPS binding protein and membrane CD14. *J Biol Chem* 1995; 270:5320-5.
93. Tapping RI, Orr SL, Lawson EM, Soldau K, Tobias PS. Membrane-anchored forms of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein do not mediate cellular responses to LPS independently of CD14. *J Immunol* 1999; 162:5483-9.
94. Dentener MA, Vreugdenhil AC, Hoet PH, et al. Production of the acute-phase protein lipopolysaccharide-binding protein by respiratory type II epithelial cells: implications for local defense to bacterial endotoxins. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23:146-53.
95. Greenwood B, Mutabingwa T. Malaria in 2002. *Nature* 2002; 415:670-2.
96. Aitman TJ, Cooper LD, Norsworthy PJ, et al. Malaria susceptibility and CD36 mutation. *Nature* 2000; 405:1015-6.
97. Luty AJ, Kun JF, Kremsner PG. Mannose-binding lectin plasma levels and gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 1998; 178:1221-4.
98. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood* 1994; 84:3613-36.
99. Vijaykumar M, Naik RS, Gowda DC. *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol-induced TNF-alpha secretion by macrophages is mediated without membrane insertion or endocytosis. *J Biol Chem* 2001; 276:6909-12.
100. Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, et al. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell

- signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* 2005; 280:8606-16.
101. Fonarow GC, Horwich TB. Prevention of heart failure: effective strategies to combat the growing epidemic. *Rev Cardiovasc Med* 2003; 4:8-17.
 102. Scheuner MT. Genetic predisposition to coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol* 2001; 16:251-60.
 103. Klouche M, Rose-John S, Schmiedt W, Bhakdi S. Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. *Circulation* 2000; 101:1799-805.
 104. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999; 138:S419-20.
 105. Mayr M, Kiechl S, Willeit J, Wick G, Xu Q. Infections, immunity, and atherosclerosis: associations of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, and cytomegalovirus with immune reactions to heat-shock protein 60 and carotid or femoral atherosclerosis. *Circulation* 2000; 102:833-9.
 106. Kirschning CJ, Schumann RR. TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270:121-44.
 107. Prebeck S, Kirschning C, Durr S, et al. Predominant role of toll-like receptor 2 versus 4 in *Chlamydia pneumoniae*-induced activation of dendritic cells. *J Immunol* 2001; 167:3316-23.
 108. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, et al. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 2003; 77:4588-96.
 109. Krug A, French AR, Barchet W, et al. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 2004; 21:107-19.
 110. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:3516-21.
 111. Adelman AG, Cohen EA, Kimball BP, et al. A comparison of directional atherectomy with balloon angioplasty for lesions of the left anterior descending coronary artery. *N Engl J Med* 1993; 329:228-33.
 112. Topol EJ, Leya F, Pinkerton CA, et al. A comparison of directional atherectomy with coronary angioplasty in patients with coronary artery disease. The CAVEAT Study Group. *N Engl J Med* 1993; 329:221-7.

113. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med* 1994; 331:489-95.
114. Mackinnon MJ, Gunawardena DM, Rajakaruna J, Weerasingha S, Mendis KN, Carter R. Quantifying genetic and nongenetic contributions to malarial infection in a Sri Lankan population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:12661-6.
115. Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Cramer JP, et al. Hemoglobin C and resistance to severe malaria in Ghanaian children. *J Infect Dis* 2004; 190:1006-9.
116. Cramer JP, Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, et al. iNOS promoter variants and severe malaria in Ghanaian children. *Trop Med Int Health* 2004; 9:1074-80.
117. Koch O, Awomoyi A, Usen S, et al. IFNGR1 gene promoter polymorphisms and susceptibility to cerebral malaria. *J Infect Dis* 2002; 185:1684-7.
118. Coban C, Ishii KJ, Kawai T, et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 2005; 201:19-25.
119. Heine H, El-Samalouti VT, Notzel C, et al. CD55/decay accelerating factor is part of the lipopolysaccharide-induced receptor complex. *Eur J Immunol* 2003; 33:1399-408.
120. Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 2002; 23:301-4.
121. Visintin A, Latz E, Monks BG, Espevik T, Golenbock DT. Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-like receptor-4 aggregation and signal transduction. *J Biol Chem* 2003; 278:48313-20.
122. Triantafilou M, Brandenburg K, Kusumoto S, et al. Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines lipopolysaccharide responses. *Biochem J* 2004; 381:527-36.
123. Triantafilou M, Triantafilou K. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J Endotoxin Res* 2005; 11:5-11.
124. Ingalls RR, Monks BG, Savedra R, Jr., et al. CD11/CD18 and CD14 share a common lipid A signaling pathway. *J Immunol* 1998; 161:5413-20.
125. Hailman E, Vasselon T, Kelley M, et al. Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of lipopolysaccharide and soluble CD14. *J Immunol* 1996; 156:4384-90.
126. Munford RS, Hall CL. Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by a human neutrophil enzyme. *Science* 1986; 234:203-5.

127. Munford RS, Andersen JM, Dietschy JM. Sites of tissue binding and uptake in vivo of bacterial lipopolysaccharide-high density lipoprotein complexes: studies in the rat and squirrel monkey. *J Clin Invest* 1981; 68:1503-13.
128. Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med* 1994; 180:1025-35.
129. Gioannini TL, Teghanemt A, Zarembler KA, Weiss JP. Regulation of interactions of endotoxin with host cells. *J Endotoxin Res* 2003; 9:401-8.
130. Gioannini TL, Teghanemt A, Zhang D, et al. Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:4186-91.
131. Joiner KA, Grossman N, Schmetz M, Leive L. C3 binds preferentially to long-chain lipopolysaccharide during alternative pathway activation by *Salmonella montevideo*. *J Immunol* 1986; 136:710-5.
132. Okamura N, Spitznagel JK. Outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 have lipopolysaccharide-dependent resistance to the bactericidal activity of anaerobic human neutrophils. *Infect Immun* 1982; 36:1086-95.
133. Nevola JJ, Stocker BA, Laux DC, Cohen PS. Colonization of the mouse intestine by an avirulent *Salmonella typhimurium* strain and its lipopolysaccharide-defective mutants. *Infect Immun* 1985; 50:152-9.
134. Schroder NW, Heine H, Alexander C, et al. Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses. *J Immunol* 2004; 173:2683-91.
135. Wright JR. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev* 1997; 77:931-62.
136. Borron P, McIntosh JC, Korfhagen TR, Whitsett JA, Taylor J, Wright JR. Surfactant-associated protein A inhibits LPS-induced cytokine and nitric oxide production in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278:L840-7.
137. Stamme C, Muller M, Hamann L, Gutschmann T, Seydel U. Surfactant protein a inhibits lipopolysaccharide-induced immune cell activation by preventing the interaction of lipopolysaccharide with lipopolysaccharide-binding protein. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27:353-60.
138. Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, et al. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1843-50.

139. Martin TR. Recognition of bacterial endotoxin in the lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23:128-32.
140. Schroder NW, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:156-64.
141. Genc MR, Vardhana S, Delaney ML, et al. Relationship between a toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine responses in pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 116:152-6.
142. Allen A, Obaro S, Bojang K, et al. Variation in Toll-like receptor 4 and susceptibility to group A meningococcal meningitis in Gambian children. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:1018-9.
143. Read RC, Pullin J, Gregory S, et al. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease. *J Infect Dis* 2001; 184:640-2.
144. Kumpf O, Hamann L, Schlag PM, Schumann RR. Pre- and postoperative cytokine release after in vitro whole blood lipopolysaccharide stimulation and frequent Toll-like receptor 4 polymorphisms. *Shock* 2005; in press.
145. Balistreri CR, Candore G, Colonna-Romano G, et al. Role of Toll-like receptor 4 in acute myocardial infarction and longevity. *Jama* 2004; 292:2339-40.
146. Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, et al. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:e61-4.
147. Yang IA, Holloway JW, Ye S. TLR4 Asp299Gly polymorphism is not associated with coronary artery stenosis. *Atherosclerosis* 2003; 170:187-90.
148. Hamann L, Hamprecht A, Gomma A, Schumann RR. Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor -2, -4, and -9 genes. *J Immunol Methods* 2004; 285:281-91.
149. Schroder NW, Hermann C, Hamann L, Gobel UB, Hartung T, Schumann RR. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR. *J Mol Med* 2003; 81:368-72.
150. Bjorkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, et al. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* 2004; 10:416-21.

151. Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:10679-84.
152. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 118:229-41.
153. Hamann L, Glaeser C, Hamprecht A, Gross M, Gomma A, Schumann RR. Toll-like receptor (TLR)-9 promoter polymorphisms and atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2005.
154. Ramasamy R. Molecular basis for evasion of host immunity and pathogenesis in malaria. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1406:10-27.
155. Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol* 2003; 133:145-52.
156. Schofield L, Hackett F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med* 1993; 177:145-53.
157. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:169-80.
158. Fortin A, Stevenson MM, Gros P. Susceptibility to malaria as a complex trait: big pressure from a tiny creature. *Hum Mol Genet* 2002; 11:2469-78.
159. Klabunde J, Uhlemann AC, Tebo AE, et al. Recognition of plasmodium falciparum proteins by mannan-binding lectin, a component of the human innate immune system. *Parasitol Res* 2002; 88:113-7.
160. Robinson BA, Welch TL, Smith JD. Widespread functional specialization of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family members to bind CD36 analysed across a parasite genome. *Mol Microbiol* 2003; 47:1265-78.

6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ralf R. Schumann der meine Arbeit jederzeit praktisch und in vielen Diskussionen auch konzeptionell unterstützt und vorangebracht hat.

Prof. Dr. Ulf B. Göbel möchte ich für die wissenschaftlich anregende Atmosphäre im Institut danken.

Prof. Artur J. Ulmer möchte ich ebenfalls für jede Unterstützung Danken.

Besonders hervorzuheben sind die Beiträge sämtlicher Koautoren, insbesondere möchte ich hier Dr. Cordula Stamme nennen, der ich viele Anregungen zu verdanken habe.

Den technischen Angestellten Katrin Klopfenstein, Ina Goroncy, Diana Woellner und Fränzi Creuzburg danke ich ebenfalls für Ihre Hilfe.

Besonders danken möchte ich meiner Familie Lisa, Jill und Luise die mich während der ganzen Zeit über unterstützt haben.

7 Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift