

Aus dem Institut für Neuropathologie  
Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Direktor: Prof. Dr. med. Frank L. Heppner

## **HABILITATIONSSCHRIFT**

### **Interaktion von bakteriellen Mikroorganismen mit Toll-like Rezeptoren und die Entstehung von Infektionskrankheiten**

zur Erlangung der Venia legendi  
für das Fach

Experimentelle Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
der Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Nicolas Wolfgang Jörg Schröder  
geboren am 18.04.1972 in Butzbach

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

eingereicht am: Mai 2008

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag: 25.06.09

Gutachter:           1. Prof. Dr. Burkhard Becher  
                          2. Prof. Dr. Ulrich Kalinke

## Zusammenfassung

Das Angeborene Immunsystem stellt eine erste Barriere gegenüber eingedrungenen Mikroorganismen dar. Die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs), deren Mitglieder unter anderem auf Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden, spielt dabei, durch die Erkennung von konservierten mikrobiellen Strukturen, eine wichtige Rolle. Die Interaktion von TLRs mit ihren Liganden führt über die Aktivierung von MyD88 zur Anschaltung einer Signaltransduktions-Kaskade und anschließend zur Expression von zahlreichen Zytokinen, die eine schnelle Immunantwort einleiten, jedoch auch eine wichtige Rolle in der Modulation der Adaptiven Immunantwort spielen. In den hier vorgelegten Arbeiten wurde die Rolle von TLRs in der Entstehung und dem Verlauf von Infektionskrankheiten untersucht.

Wir konnten bis dato unbekannte Glykolipide aus Bakterien der Gattung *Treponema* isolieren und chemisch charakterisieren, die eine Freisetzung von Zytokinen in Abhängigkeit von CD14, dem Lipopolysaccharid Bindenden Protein (LBP) sowie TLR2 bewirken. Der gleiche Rezeptor-Komplex spielt auch bei der Erkennung von Lipoteichonsäure (LTA) aus Gram-positiven Bakterien sowie bakteriellen Lipoproteinen und Lipopeptiden eine wichtige Rolle.

Die Rolle der Erkennung von TLR2-Liganden durch LBP konnte in einem Mausmodell der Meningitis nachgewiesen werden, wobei LBP-defiziente Mäuse nach intrathekaler Gabe von Pneumokokken-Extrakten deutlich verminderte Entzündungsreaktionen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigten. Darüber hinaus konnte in einem Modell der bakteriellen Pneumonie in MyD88-defizienten Mäusen eine prolongierte Entzündung mit gesteigerter Letalität gezeigt werden, was auf eine wichtige Rolle der TLR-abhängigen Signaltransduktion in der Bekämpfung von Infektionen hinweist.

Schließlich konnten wir zeigen, dass die Anwesenheit von genetischen Varianten von TLR2 oder -4, die mit einer verringerten zellulären Aktivierung einhergehen, mit einem veränderten Risiko bezüglich Inzidenz und Verlauf von Infektionskrankheiten assoziiert ist.

Diese Arbeiten zeigen die Grundprinzipien der Erkennung von Bakterien durch TLRs, und verdeutlichen darüber hinaus die Bedeutung der TLR-vermittelten Signaltransduktion für die Entstehung und den Verlauf von Infektionskrankheiten.

## Summary

Innate Immunity acts as a first barrier against invading microorganisms. The family of Toll-like receptors (TLRs), which are also expressed on antigen presenting cells, is crucially involved in these processes via recognition of conserved microbial partial structures. The interaction of TLRs with their respective ligands causes the expression of multiple cytokines via a signal transduction cascade involving MyD88. This initiates not only a rapid immune response, but adaptive immune responses as well. Within the studies presented here, the role of TLRs in incidence and course of infectious diseases was studied.

We were able to isolate and characterize novel glycolipids from bacteria of the genus *Treponema*, which cause the release of cytokines via a pathway involving CD14, Lipopolysaccharide (LPS) Binding Protein (LBP) and TLR2. The same receptor complex is involved in the recognition of Lipoteichoic Acid (LTA) from Gram-positive bacteria as well as lipoproteins and lipopeptides as well.

The role of LBP in the recognition of TLR2-ligands was demonstrated in a murine meningitis model, where LBP-deficient mice displayed markedly reduced inflammatory responses after intrathecal injection of pneumococcal partial structures. Additionally, a prolonged inflammatory response combined with increased mortality could be shown in MyD88-deficient mice as compared to wild type mice in a model of pneumonia, indicating an important role of TLR-activation in combating infections.

Finally, we were able to show that the presence of genetic variants of TLR2 or -4, which cause a reduced cellular activation, are associated with different courses of infectious diseases.

This work demonstrates the basic principles of immune recognition of bacteria by TLRs, and furthermore clarifies the importance of TLR-mediated cellular activation for the incidence and course of infectious diseases.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	7
1.1. Das Angeborene Immunsystem	7
1.2. Lipopolysaccharid und Toll-like Rezeptoren	8
1.3. TLR2 und seine Liganden	10
1.4. TLR-abhängige Signaltransduktions-Kaskaden	12
1.5. Auswirkungen einer TLR-Defizienz in Mausmodellen von Infektions- Krankheiten	13
1.6. Genetische Polymorphismen von TLRs und ihr Einfluss auf Ent- stehung und Verlauf von Infektionskrankheiten	14
2. Ergebnisse	16
2.1. Biologische und chemische Charakteristika von TLR-Liganden	17
2.1.1. Struktur-Funktions Analyse von Glykolipiden aus Spirochaeten	17
N.W.J. Schröder, B. Opitz, N. Lamping, K.S. Michelsen, U. Zähringer, U.B. Göbel, und R.R. Schumann. Involvement of Lipopolysaccharide Binding Protein, CD14, and Toll-like Receptors in the Initiation of Innate Immune Responses by <i>Treponema</i> Glycolipids. <i>J.</i> <i>Immunol.</i> , 165: 2683-2693. 2000.	
2.1.2. Biologische Charakteristika von LTA Gram-positiver Bakterien	18
N.W.J. Schröder, S. Morath, C. Alexander, L. Hamann, U. Zähringer, T. Hartung, U. B. Göbel, J. R. Weber, und R. R. Schumann. Lipoteichoic acid (LTA) of <i>S. pneumoniae</i> and <i>S. aureus</i> activates immune cells via toll-like receptor (TLR)-2, LPS binding protein (LBP) and CD14 while TLR-4 and MD-2 are not involved. <i>J. Biol. Chem.</i> , 278: 15587-15594. 2003	
2.1.3. Biologische Charakteristika von diacylierten und triacylierten Lipopeptiden	19
N.W.J. Schröder, H. Heine, C. Alexander, M. Manukyan, J. Eckert, L. Hamann, U.B. Gö- bel, und R.R. Schumann. Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and dia- cylated lipopeptides and mediates innate immune responses. <i>J. Immunol.</i> 173: 2683- 2691. 2004	
2.2. Untersuchungen zur Auswirkung der TLR-vermittelten zellulären Aktivierung in <i>in vivo</i> Modellen	20
2.2.1. Hinweise auf eine Interaktion von TLR2-Liganden mit dem LPS-Bindenden Protein (LBP) in einem Mausmodell der Meningitis	20
J.R. Weber, D. Freyer, C. Alexander, N.W.J. Schröder, A. Reiss, C. Küster, D. Pfeil, E.I. Tuomanen und R.R. Schumann. Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an ex- panded, pivotal role for LPS binding protein. <i>Immunity</i> , 19: 269-279. 2003	

2.2.2.	Auswirkungen des Fehlens von TLR-vermittelter Signaltransduktion in einem Infektionsmodell in der Maus	21
	Y. Naiki, K. S. Michelsen, N.W.J. Schröder, R. Alsabeh, A. Slepkin, W. Zhang, S. Chen, B. Wei, Y. Bulut, M.H. Wong, E.M. Peterson, und M. Arditì. MyD88 is Pivotal for the Early Inflammatory Response and Subsequent Bacterial Clearance and Survival in a Mouse Model of <i>Chlamydia pneumoniae</i> pneumonia. <i>J. Biol. Chem.</i> 280: 29242-29249. 2005	
2.3	Studien zur Auswirkung von TLR-Polymorphismen auf Inzidenz und Verlauf von Infektionskrankheiten	22
2.3.1.	Inzidenz und Effekt des Arg753Gln Polymorphismus des humanen TLR2	22
	N.W.J. Schröder, C. Hermann, L. Hamann, U. B. Göbel, T. Hartung, und R. R. Schumann. High Frequency of Polymorphism Arg753Gln of the Toll-like Receptor-2 (TLR-2) Gene Detected by A Novel Allele Specific PCR. <i>J. Mol. Med.</i> , 81: 368-372. 2003	
2.3.2.	Auswirkungen des Asp299Gly und Thr399Ile Polymorphismus des TLR4-Gens auf die Inzidenz der Parodontitis	23
	N.W.J. Schröder, D. Meister, V. Wolff, C. Christan, D. Kaner, V. Haban, P. Purrucker, C. Hermann, A. Moter, U.B. Göbel, and R.R. Schumann. Chronic Periodontal Disease is Associated with Single-Nucleotide Polymorphisms of the Human TLR-4 Gene. <i>Genes Immun.</i> 6: 448-451. 2005.	
2.3.3.	Der Arg753Gln Polymorphismus des humanen TLR2 vermindert die zelluläre Aktivierung durch <i>Borrelia burgdorferi</i> und schützt vor den Spätstadien der Borreliose	24
	N.W.J. Schröder, I. Diterich, A. Zinke, J. Eckert, C. Draing, V. v. Baehr, D. Hassler, S. Priem, K. Hahn, K.S. Michelsen, T. Hartung, G.R. Burmester, U.B. Göbel, C. Hermann, and R.R. Schumann. Heterozygous Arg753Gln Polymorphism of Human TLR-2 Impairs Immune Activation by <i>Borrelia burgdorferi</i> and Protects from Late Stage Lyme Disease. <i>J. Immunol.</i> 175: 2534-2540. 2005	
3.	Diskussion	
3.1.	Chemische und biologische Charakteristika von bakteriellen TLR-Liganden	25
3.2.	Einfluss der TLR-vermittelten Signaltransduktion auf die Immunantwort	27
3.3.	Einfluss von TLR-Polymorphismen auf Inzidenz und Verlauf von Krankheiten	29
3.4.	Ausblick	31
	Literaturverzeichnis	33
	Liste eigener Veröffentlichungen	43
	Danksagung	47
	Eidesstattliche Erklärung	48

## Abkürzungsverzeichnis

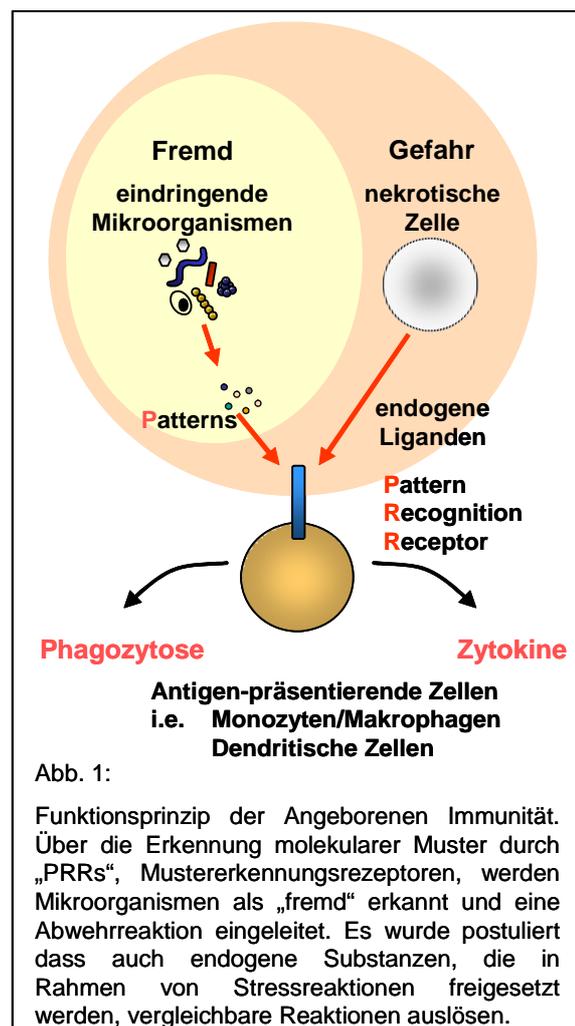
ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
Arg	Arginin
Asp	Asparagin
AP	Aggressive Parodontitis
CD14	<i>englisch</i> : cluster of differentiation marker 14
CP	Chronische Parodontitis
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Ile	Isoleuzin
IRAK	<i>englisch</i> : IL-1 receptor associated kinase
Kdo	3-Desoxy-D-Manno-Octulosonsäure
LA	Lyme Arthritis
LBP	LPS Bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>englisch</i> : leucin rich repeats
LTA	Lipoteichonsäure
MD-2	<i>englisch</i> : myeloid differentiation factor 2
NF- $\kappa$ B	<i>englisch</i> : nuclear factor $\kappa$ B
MyD88	<i>englisch</i> : myeloid differentiation primary response gene 88
PRR	<i>englisch</i> : pattern recognition receptor
RSV	<i>englisch</i> : respiratory syncytial virus
SNP	<i>englisch</i> : single nucleotide polymorphism
TGF	<i>englisch</i> : transforming growth factor
Thr	Threonin
TIR-Domäne	Toll/IL-1 Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrose-Faktor
TRAF	<i>englisch</i> : TNF-receptor associated factor
TRIF	<i>englisch</i> : TIR-domain adapter inducing interferon $\beta$

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Angeborene Immunsystem

Der Begriff "Angeborenes Immunsystem" (*englisch*: Innate Immunity) wurde in den 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts von Charles Janeway geprägt. Er bezeichnet jenen Zweig des Immunsystems, der als ein erstes Abwehrsystem gegenüber in den Wirt eingedrungene Erreger agiert (Medzhitov and Janeway 1997). Auf zellulärer Ebene wird diese Barriere in erster Linie durch Antigen-präsentierende Zellen, also Makrophagen und Dendritische Zellen, aber auch durch andere Zelltypen wie Granulozyten oder "natural killer" (NK)-Zellen gebildet. Die Angeborene Immunantwort wird meist der Adaptiven Immunantwort gegenübergestellt, deren Träger in erster Linie T- und B-Lymphozyten sind. Das grundlegende Funktionsprinzip des Angeborenen Immunsystems basiert auf der Erkennung von unveränderlichen Merkmalen von Mikroorganismen, die diese eindeutig von Strukturen des Wirts abgrenzen.

Durch Erkennung dieser "Muster" (*englisch*: pattern) über spezielle Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen des Immunsystems, so genannter "Mustererkennungs-Rezeptoren" (*englisch*: pattern recognition receptors, PRRs, Abb. 1), werden die Mikroorganismen als "fremd" erkannt und die Abtötung durch Phagozytose eingeleitet. Zusätzlich wird aber auch die Freisetzung von Zytokinen bewirkt, die die Immunantwort verstärken können. Um eine effektive Immunantwort auszulösen, müssen mikrobielle Muster eine Reihe von Kriterien erfüllen: sie müssen 1) eindeutig von Strukturen des Wirts unterscheidbar sein. 2) für den Erreger lebenswichtige Funktionen erfüllen, d.h. nicht ohne massive Einschränkung der Vitalität ersetzbar sein.



Daraus erklärt sich, dass viele mikrobielle Muster auf der Zelloberfläche ausgebildete Kohlenhydrat- oder Glykolipid-Strukturen, wie z.B. Mannose-haltige Kohlenhydrate (Linehan et al. 2000) oder auch Lipopolysaccharide (Alexander and Rietschel 2001) sind.

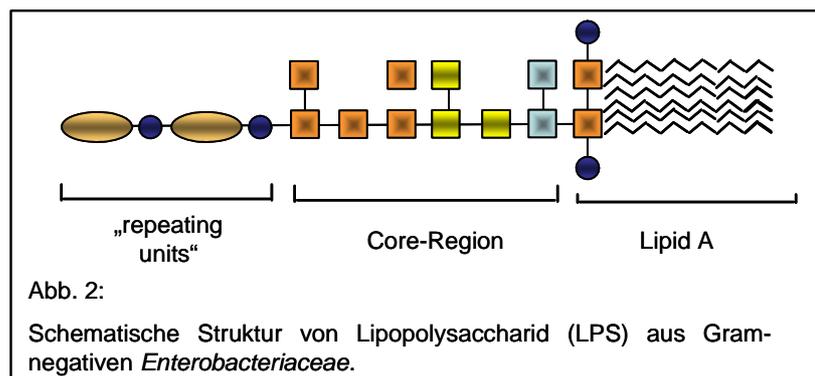
Es wurde zusätzlich postuliert, dass das Angeborene Immunsystem neben fremden Strukturen auch körpereigene Strukturen, die ausschließlich in Gefahrensituationen aktiv sezerniert oder als Folge von Gewebnekrosen passiv freigesetzt werden, erkennt. Diese Theorie wird auch als Gefahrenhypothese ("danger hypothesis", Abb. 1) bezeichnet (Matzinger 2002). In der Fachliteratur finden sich zahlreiche Berichte über körpereigene Strukturen, die Entzündungsreaktionen auslösen können, darunter Harnsäure (Shi et al. 2003) und das nuclear protein high-mobility group box 1 (HMGB1)-Protein (Tsong et al. 2007). Die "danger hypothesis" ist jedoch nicht unumstritten, und die hier vorgestellten Arbeiten beziehen sich ausschließlich auf die Interaktion des Angeborenen Immunsystems mit exogenen Liganden.

Wie oben erwähnt, führt die Interaktion von mikrobiellen Liganden mit PRRs zur Freisetzung von Zytokinen, die über die Phagozytose der Mikroorganismen hinaus die Immunantwort entscheidend modulieren können. Man unterscheidet hier zwischen pro-inflammatorischen Zytokinen, die die Immunantwort verstärken, wie Tumornekrose-Faktor (TNF) und Interleukin (IL)-12p70, und so genannten anti-inflammatorischen Zytokinen, wie Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$  oder IL-10. Diese Zytokine beeinflussen entscheidend den Phänotyp Antigen-spezifischer T-Zellen. Dadurch erfüllt die Angeborene Immunität, über die wohlbekannte Rolle als erste Barriere gegenüber Krankheitserregern hinaus, entscheidende Funktionen in Bezug auf die Adaptive Immunantwort (Pasare and Medzhitov 2003).

## **1.2. Lipopolysaccharid und Toll-like Rezeptoren**

Lipopolysaccharide (LPS) Gram-negativer Bakterien sind Glykolipide, sie bestehen also aus einem Lipidanteil und einem Kohlenhydratanteil. Der Lipidanteil von LPS, der in der äußeren Membran der Bakterien verankert ist, wird als Lipid A bezeichnet und enthält meist sechs Fettsäuren, darunter auch so genannte  $\beta$ -Hydroxy-

Fettsäuren (Galanos et al. 1985; Alexander and Rietschel 2001). Der Kohlenhydratanteil besteht aus einer so genannten "core"-Region, die Heptose und 3-Desoxy-D-Manno-Octuloson-säure (Kdo) enthält, sowie sich wiederholender Einheiten von Kohlenhydratbausteinen (*englisch*: "repeating units", Abb. 2). LPS kann über die Aktivierung von Monozyten und nachfolgender Freisetzung von Zytokinen, insbesondere TNF, das klinische Bild eines septischen Schocks auslösen (Beutler and Rietschel 2003). Der biologisch aktive Teil, also der Bereich, der über Interaktion von PRRs die zelluläre Aktivierung und nachfolgende Zytokin-Freisetzung bewirkt, ist dabei das Lipid A (Galanos et al. 1985; Raetz and Whitfield 2002). Einige an der durch LPS verursachten Zytokininduktion beteiligten PRRs konnten bereits in den frühen 90er Jahren des letzten Jahrhunderts charakterisiert werden: LPS wird durch das LPS Bindende Protein (LBP), ein Serumprotein, das in der Leber gebildet wird, über das Lipid A gebunden und an CD14, einen membranständigen Rezeptor auf Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen, übertragen (Schumann et al. 1990; Wright et al. 1990). Da CD14 über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Zellmembran verankert ist und keine transmembranäre Domäne besitzt, war schon von Beginn an offensichtlich, dass der LPS-Rezeptor-Komplex eine weitere, damals unbekannte Komponente beinhalten muss, die das Signal ins Zellinnere leitet. Besonderes Interesse galt in diesem Zusammenhang einem Mausstamm, der nach einer spontanen Mutation hyporesponsiv gegenüber LPS geworden war, dem C3H/HeJ-Stamm (Heppner and Weiss 1965). Diese Mutation betraf ein einzelnes Gen, das die Bezeichnung *Lps* erhielt (Watson and Riblet 1974; Watson and Riblet 1975) und nach dessen Genprodukt in der Folgezeit intensiv gesucht wurde.



Parallel ergaben sich Hinweise auf die Identität des LPS-Rezeptors aus einem vergleichsweise weit entfernten Forschungsgebiet, dem der Embryonalentwicklung. Am Labor von Christiane Nüsslein-Vollhardt wurde 1985 ein Protein identifiziert, das den Namen "Toll" erhielt und maßgeblich an der Embryonalentwicklung in *Drosophila* beteiligt ist (Anderson et al. 1985). Interessanterweise zeigte der Signaltransduktionsweg von Toll auffällige Ähnlichkeiten von dem des IL-1 in Säugetieren, was Un-

tersuchungen zur Rolle von Toll in der Infektabwehr von *Drosophila* veranlasste. Tatsächlich wurde festgestellt, dass Toll-defiziente *Drosophila* eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer Infektion mit *Aspergillus* aufweisen (Lemaitre et al. 1996). Dies veranlasste wiederum eine intensive Suche nach Homologen von Toll, Toll-like Rezeptoren (TLRs), in Säugetieren und führte zur Identifizierung der Gene zunächst für TLR1 (Taguchi et al. 1996) und nachfolgend für eine Reihe fünf weiterer putativer Rezeptoren, die als Toll-like Rezeptoren 1-5 bezeichnet wurden (Rock et al. 1998). Mittlerweile konnten elf TLRs in Menschen und dreizehn TLRs in Mäusen identifiziert werden (Kawai and Akira 2007). Alle bisher identifizierten TLRs besitzen dabei einen vergleichbaren Aufbau, der unter anderem eine Liganden-Bindungsstelle in Form so genannter "leucin rich repeats" (LRRs) sowie eine Signaltransduktions-Domäne, die so genannte Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne, umfasst (O'Neill 2002; Kawai and Akira 2007).

Zeitgleich mit der Entdeckung von TLRs konnte das Genprodukt von *Lps* als TLR4 identifiziert werden (Poltorak et al. 1998). Der Defekt in C3H/HeJ-Mäusen wurde als Folge eines Austauschs von Prolin durch Histidin innerhalb der intrazellulären Domäne von TLR4, der man eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion zuwies, identifiziert (Poltorak et al. 1998). Die Rolle von murinem TLR4 in der Erkennung von LPS konnte durch die gezielte Deletion dieses Rezeptors durch die Generation einer TLR4 knock-out Maus am Labor von Shizuo Akira bestätigt werden (Hoshino et al. 1999). Schließlich konnte auch der humane TLR4 als Rezeptor für LPS identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde das zuvor identifizierte TLR4 kloniert, in der humanen embryonalen Nierenepithel-Zelllinie HEK-293 exprimiert und die Zellen mit LPS stimuliert (Chow et al. 1999). Kurz darauf folgte die Identifizierung von myeloid differentiation factor (MD)-2, eines extrazellulären Adaptermoleküls für TLR4 (Shimazu et al. 1999). Damit war der Aufbau des Rezeptor-Komplexes für LPS, bestehend aus TLR4, CD14 und MD-2, aufgeklärt (Abb. 3).

### **1.3. TLR2 und seine Liganden**

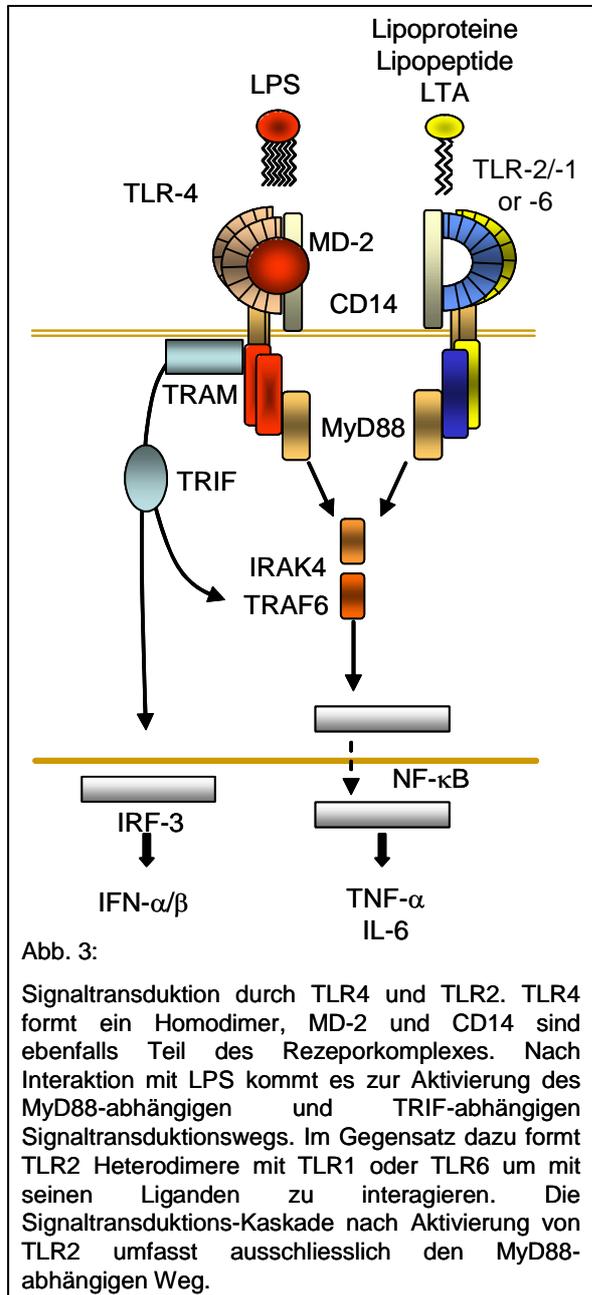
Ursprünglich wurde 1998, von zwei Labors gleichzeitig, der humane TLR2 als Rezeptor für LPS beschrieben (Kirschning et al. 1998; Yang et al. 1998). Beide Untersucher hatten TLR2 in der embryonalen Nierenepithel-Zelllinie HEK-293 exprimiert und die

Zellen mit LPS stimuliert. In der von Kirschning et al. publizierten Studie wurden zusätzlich TLR1 und TLR4 getestet, wobei TLR4 durch eine hohe Spontan-Aktivierung der Zellen auffiel, die durch LPS jedoch nicht erhöht werden konnte (Kirschning et al. 1998). Kurze Zeit später wurde von einer dieser Arbeitsgruppen, unter Verwendung des gleichen auf HEK-293 Zellen beruhenden Testsystems, der humane TLR2 als Rezeptor für Zellwandkomponenten Gram-positiver Bakterien, nämlich Peptidoglykan und Lipoteichonsäure (LTA), identifiziert (Schwandner et al. 1999). Gleichzeitig erfolgte unter Verwendung des gleichen Testsystems die Identifikation von Lipoproteinen aus *Borrelia burgdorferi* und Lipoarabinomannan aus *Mycobacterium tuberculosis* als TLR2-Liganden (Lien et al. 1999). Die Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen und der ursprünglichen Beschreibung von TLR2 als LPS Rezeptor wurde von Seiten der Autoren niemals erläutert, ist aber möglicherweise durch Kontamination der ursprünglich verwendeten LPS-Präparation mit TLR2-Liganden verursacht (Hirschfeld et al. 2000). Ähnliche Befunde bezüglich der Liganden des TLR2 wurden mit der TLR2-defizienten Maus erhoben, die abermals am Labor von Shizuo Akira generiert wurde und ebenfalls eine verminderte Reaktion auf Peptidoglykan zeigte. In dieser Studie agierten die verwendeten kommerziell erhältlichen LTA-Präparationen allerdings auch mit TLR4 (Takeuchi et al. 1999).

Später wurden Studien veröffentlicht, die zeigten dass TLR2 neben Peptidoglykan auch eine weitere Klasse bakterieller Liganden, die Lipoproteine bzw. Lipopeptide, erkennen kann (Takeuchi et al. 2000; Nishiguchi et al. 2001; Takeuchi et al. 2001; Takeuchi et al. 2002). Dabei wurde ein weiteres Charakteristikum von TLR2 aufgedeckt: Während TLR4 Homodimere ausbildet, kann TLR2 Heterodimere entweder mit TLR1 oder TLR6 bilden (Ozinsky et al. 2000; Takeuchi et al. 2001; Takeuchi et al. 2002). Lipoproteine, die drei Fettsäuren enthalten und in Spirochäten, insbesondere *Borrelia burgdorferi*, als Komponenten der äußeren Membran vorkommen, interagieren mit TLR2/TLR1-Heterodimeren (Sellati et al. 1998; Takeuchi et al. 2002). Im Gegensatz dazu benötigen Lipopeptide, die zwei Fettsäuren enthalten und u.a. in *Mycoplasma* spp. zu finden sind, wie auch LTA die Anwesenheit von TLR2/TLR6 Heterodimeren (Garcia et al. 1998; Takeuchi et al. 2001). Diese Daten wurden unter der Verwendung von TLR1- bzw. TLR6-knock-out Mäusen erhoben. Im Gegensatz dazu wurde durch Expression von TLR2 und TLR6 in humanen HEK-293 Zellen eine Steigerung der Aktivierbarkeit durch Lipoproteine gefunden (Bulut et al. 2001). Zusätzlich

wurde postuliert, dass der TLR2-Rezeptorkomplex, ähnlich wie TLR4, MD-2 zur Interaktion mit seinen Liganden benötigt (Dziarski et al. 2001).

Im Gegensatz zu TLR4, der von der Mehrzahl der Untersucher als spezifisch für LPS



angesehen wird, existieren für TLR2 eine Reihe strukturell sehr unterschiedlicher Liganden, und die Befunde verschiedener Untersucher widersprechen einander zunächst. Die ersten Publikationen bezüglich TLR2 Liganden hatten kommerziell erhältliche LTA-Präparationen, die einen hohen Anteil an struktureller Degeneration und Heterogenität aufweisen (Morath et al. 2002), verwendet. Ein wichtiger Durchbruch in Bezug auf die Identifikation von LTA als Auslöser entzündlicher Reaktionen gelang durch die Entwicklung eines schonenden Aufreinigungsverfahrens von LTA unter der Verwendung von Butanol bei Raumtemperatur (im Gegensatz zu der zu diesem Zeitpunkt etablierten Methode mit Phenol bei 68 °C (Morath et al. 2001)). Diese Präparation war biologisch aktiv, und die Aktivität konnte auf den Grad der Substitution der LTA mit Alanyl-Resten zurückgeführt werden.

#### 1.4. TLR-abhängige Signaltransduktions-Kaskaden

Etwa zeitgleich mit der Identifizierung der Liganden von TLR4 und TLR2 erfolgte die Aufklärung der TLR-abhängigen Signaltransduktions-Kaskade. Eine wichtige Bedeutung hat hier das Adaptermolekül MyD88 (myeloid differentiation primary response

gene 88). Durch Untersuchungen an MyD88 knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass dieses Molekül eine wichtige Rolle sowohl in der IL-1 Signaltransduktions-Kaskade (Adachi et al. 1998) als auch in der zellulären Aktivierung durch TLRs spielt (Kawai et al. 1999). MyD88 interagiert dabei mit der intrazellulären TIR-Domäne (O'Neill 2002). Darauf folgt eine Interaktion der TIR-Domäne von MyD88 mit der IL-1 receptor associated kinase (IRAK)-1 (Adachi et al. 1998), was schließlich über die Aktivierung von TNF-receptor associated factor (TRAF)-6 in der Bildung von nuclear factor (NF)- $\kappa$ B Dimeren einmündet, die die Transkription von pro-inflammatorischen Zytokinen einleiten (Beutler 2004). Es gab jedoch auch Hinweise, dass höhere Dosen von LPS auch in MyD88-defizienten Mäusen Immunreaktionen hervorrufen konnten (Kaisho et al. 2002), weshalb ein MyD88-unabhängiger Signaltransduktionsweg postuliert wurde. Dieses Phänomen konnte durch die Identifizierung eines weiteren Adaptermoleküls, dem TIR-domain adaptor inducing interferon  $\beta$  (TRIF) geklärt werden (Hoebe et al. 2003; Yamamoto et al. 2003). Dabei führt die Aktivierung von TRIF nach Interaktion von TLR4 mit LPS zu der Induktion von Interferon  $\alpha$  und  $\beta$ .

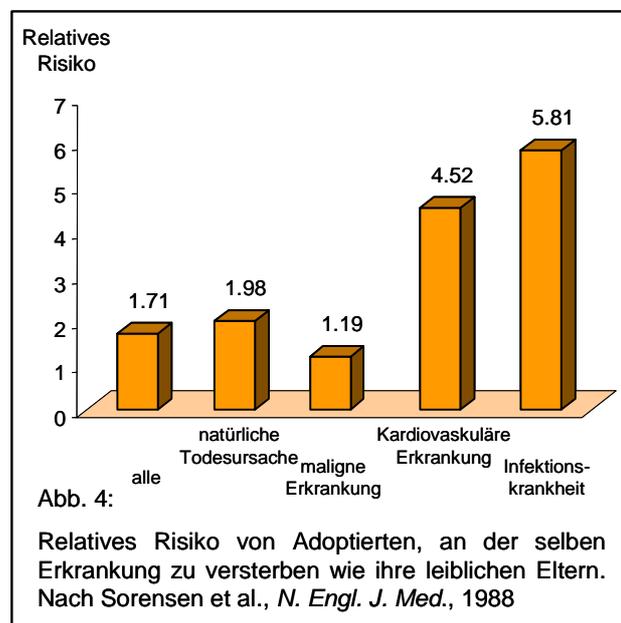
### **1.5. Auswirkungen einer TLR-Defizienz in Mausmodellen von Infektionskrankheiten**

Schon durch Beobachtungen an der C3H/HeJ Maus, lange Zeit bevor TLRs identifiziert werden konnten, wurde deutlich, dass die Unfähigkeit auf LPS mit der Freisetzung von Zytokinen zu reagieren mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen verbunden ist. Neben der spontanen Entwicklung von Infektionen des Mittelohrs (Mitchell et al. 1997) verstarben diese Tiere an Infektionen mit Gram-negativen Erregern, die von entsprechenden Wildtyp-Mäusen überlebt wurden, darunter *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* und *Neisseria meningitidis* (O'Brien et al. 1980; Hagberg et al. 1984; Woods et al. 1988). Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Untersuchungen an LBP-defizienten Mäusen gefunden, bei denen der Transfer von LPS an CD14 gestört ist (Jack et al. 1997). Diese Daten verdeutlichten, dass die Erkennung von LPS, trotz der damit verbundenen, für den Wirt zum Teil katastrophalen Auswirkungen im Kontext eines septischen Geschehens (Beutler and Rietschel 2003), von großer Wichtigkeit für die effektive Abwehr von Infektionserregern ist. Dementsprechend wurde auch in Mäusen, in denen MyD88 oder TLR2 ausgeschaltet war, eine erhöhte Letalität nach Infektion mit Gram-positiven Erregern wie *Staphylococcus au-*

*reus* gefunden (Takeuchi et al. 2000). Es folgten eine Reihe von weiteren Untersuchungen zur Rolle von TLRs und MyD88 in bakteriellen Infektionen mit ähnlichem Ergebnis, also schwereren Symptomen und erhöhter Letalität in der Abwesenheit von TLRs und/oder MyD88 (Fremont et al. 2004; Koedel et al. 2004; Archer and Roy 2006).

### 1.6. Genetische Polymorphismen von TLRs und ihr Einfluss auf Entstehung und Verlauf von Krankheiten

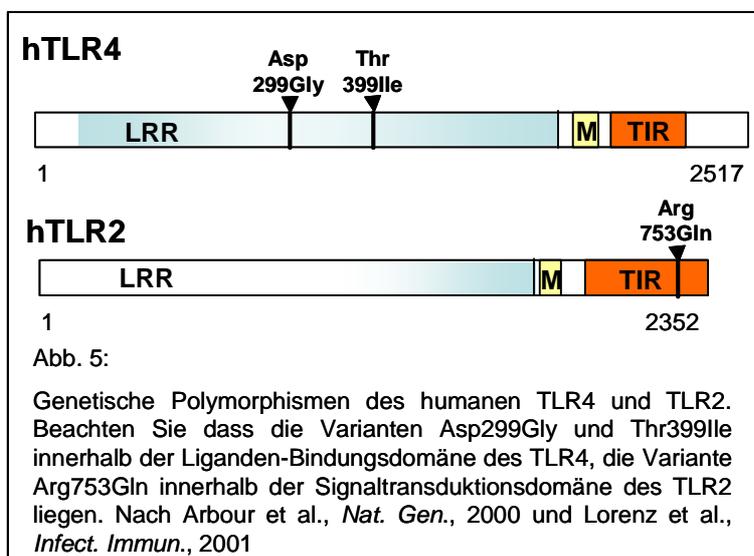
Eine der wohl bekanntesten Konstellationen, in der eine genetische Variante den Verlauf einer Infektionskrankheit (in diesem Falle positiv im Sinne eines milderen Verlaufs) beeinflusst, ist die Sichelzellanämie und die Malaria. In diesem Falle sind Personen, die heterozygot für das Hämoglobin S sind, vor der Infektion mit *Plasmodium falciparum* geschützt (Allison 1954). Dass diese Assoziation einer genetischen Konstellation mit der Anfälligkeit gegenüber einer Infektionskrankheit kein Einzelfall ist, konnte durch eine Studie an ca. 1000 Adoptivkindern in Dänemark eindrucksvoll unter Beweis gestellt werden (Sorensen et al. 1988). Hier zeigte sich, dass Kinder ein gegenüber der Normalbevölkerung um den Faktor 5,81 erhöhtes Risiko besaßen an einer Infektionskrankheit zu versterben, wenn eines ihrer beiden Elternteile an einer Infektion verstorben war (Sorensen et al. 1988). Diese Beziehung war - in dieser Studie - ausgeprägter als die von kardiovaskulären Erkrankungen (Faktor 4,52). Dass auch Defekte innerhalb von Genen, die an der TLR-vermittelten Signaltransduktion beteiligt



sind, massive Auswirkungen auf die Widerstandsfähigkeit des Wirts gegenüber bakteriellen Erregern haben, zeigen Fälle von Patienten, die Mutationen des IRAK1-Gens besitzen. Hier kommt es im Kindesalter zu schweren rezidivierenden bakteriellen Infekten insbesondere des Respirations- und Urogenitaltrakts (Picard et al. 2003).

Genetische Polymorphismen, d.h. genetische Varianten, die mit einer Häufigkeit von mehr als 1 % innerhalb einer Population vorkommen, wurden im Bezug auf TLRs erstmals im Jahr 2000 beschrieben. Arbour et al. suchten nach genetischen Determinanten, die die unterschiedlich stark ausgeprägten asthmatischen Reaktionen von Probanden nach Inhalation von LPS verursachten (Arbour et al. 2000). Unter Probanden, die auf die Inhalation von LPS nicht reagierten, fand sich mit signifikant erhöhter Frequenz die Kombination der Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile, die zwei ausgetauschte Aminosäuren innerhalb der LRRs zur Folge haben (Arbour et al. 2000). Die verminderte Zytokinfreisetzung konnte durch *in vitro* Experimente mit isolierten Alveolar-Epithelzellen und transfizierten Makrophagen-Zelllinien bestätigt werden (Arbour et al. 2000). Es folgten eine Reihe von Studien, die mögliche Assoziationen dieser Polymorphismen mit der Inzidenz und/oder dem Verlauf von Infektionskrankheiten aufzudecken suchten. So wurde eine positive Korrelation von Asp299Gly und Thr399Ile mit der Inzidenz von nosokomialen Infektionen mit Gram-negativen Erregern (Agnese et al. 2002), der Inzidenz des septischen Schocks (Lorenz et al. 2001) oder respiratorischen Infektionen mit Respiratory Syncytial Virus (RSV) be-

schrieben (Tal et al. 2004). In der Folge wurden auch Polymorphismen von anderen TLRs beschrieben, zum Teil ebenfalls mit positiven Korrelationen in Bezug auf Infektionskrankheiten, darunter TLR2 (Lorenz et al. 2000) und TLR5 (Hawn et al. 2003; Schröder and Schumann 2005; Misch and Hawn 2008).



## 2. Ergebnisse

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Arbeiten beschäftigen sich mit Aspekten der angeborenen Immunität, wobei die Interaktion von Komponenten bakterieller Herkunft mit TLRs im Mittelpunkt steht.

Ein Teil der hier vorgestellten Arbeiten (2.1.) beschäftigt sich deshalb mit den biologischen und chemischen Charakteristika von TLR-Liganden. Im Mittelpunkt der Arbeiten stehen hier Liganden, die an unserem Labor isoliert, aufgereinigt und charakterisiert (Treponemen-Glykolipide, 2.1.1.), durch Verwendung neuer Aufreinigungsverfahren isoliert und durch Kooperationspartner zu Verfügung gestellt (*S. aureus* LTA, 2.1.2.) oder kommerziell erworben wurden (bakterielle Lipopeptide, 2.1.3.). Ziel dieser Arbeiten war es, durch Verwendung hochreiner Präparationen bekannter und unbekannter Liganden eindeutige Aussagen bezüglich der Mechanismen der ausgelösten Signaltransduktion treffen zu können.

Im darauf folgenden Abschnitt (2.2.) werden Arbeiten vorgestellt, die sich mit der Rolle der TLR-vermittelten Signaltransduktion *in vivo* anhand von Mausmodellen beschäftigen. Im Mittelpunkt steht hier ein Meningitis-Modell, das auf der intrathekalen Injektion von TLR-Liganden beruht (2.2.1.) sowie ein Modell der durch *Chlamydia pneumoniae* verursachten Pneumonie (2.2.2.).

Schließlich wird der Einfluss von TLR-vermittelter Signaltransduktion auf den Verlauf von Infektionskrankheiten anhand von Untersuchungen zur Auswirkung von TLR-Polymorphismen untersucht (2.3.). Hier werden Untersuchungen zu Häufigkeit und Effekt des Arg753Gln-Polymorphismus aufgeführt (2.3.1.). Es folgen Untersuchungen zum Einfluss dieser Variante sowie des Polymorphismus Asp299Gly und Thr399Ile des TLR4 auf die Inzidenz von Parodontalerkrankungen (2.3.2.) sowie eine Studie bezüglich des Effekts von Arg753Gln auf Erkennung von *B. burgdorferi* sowie Inzidenz und Verlauf der Borreliose (2.3.3.).

## 2.1. Biologische und chemische Charakteristika von TLR-Liganden

### 2.1.1. Struktur-Funktions Analyse von Glykolipiden aus Spirochaeten

**N.W.J. Schröder**, B. Opitz, N. Lamping, K.S. Michelsen, U. Zähringer, U.B. Göbel, und R.R. Schumann. Involvement of Lipopolysaccharide Binding Protein, CD14, and Toll-like Receptors in the Initiation of Innate Immune Responses by *Treponema* Glycolipids. *J. Immunol.*, 165: 2683-2693. 2000.

Treponemen werden zu den Spirochaeten gezählt, einer Familie von schraubenförmigen Bakterien die sich durch einen einzigartigen Wandaufbau von anderen Bakterien unterscheidet. Bekanntester Vertreter der Gattung *Treponema* ist *T. pallidum*, der Erreger der Syphilis. Orale Treponemen werden mit der Pathogenese der Parodontitis in Verbindung gebracht. In dieser Arbeit wurde untersucht ob zwei zuvor am Institut für Mikrobiologie der Charité isolierte Treponemenarten, *T. maltophilum* und *T. brennaborensis*, biologisch aktive Glykolipide in ihrer äußeren Membran ausbilden und ob es sich dabei, wie in der Literatur vielfach behauptet, um LPS handelt.

Zellkultur-Überstände aus Kulturen beider Treponemen induzierten die Freisetzung von TNF- $\alpha$  in humanen Monozyten sowie in der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7. Mittels Butanol-Extraktion der Überstände konnten Substanzen aufgereinigt werden, die ebenfalls biologisch aktiv waren und ein an Glykolipide erinnerndes Verhalten in der Gelelektrophorese zeigten. Durch Phenol/Wasser Extraktion von ganzen Bakterien-Zellen beider Treponemenstämme wurden diese putativen Glykolipide in Mengen isoliert, die eine chemische Charakterisierung mittels Gas-liquid Chromatographie und kombinierter Gas-liquid Chromatographie/Massenspektroskopie (in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. U. Zähringer, Forschungszentrum Borstel) ermöglichte. Dabei stellte sich heraus, dass beide Extrakte, insbesondere durch das Vorhandensein eines Diacyl-Glyzerin-Lipidankers, Lipoteichonsäuren (LTA) Gram-positiver Bakterien stark ähnelten. Beide Glykolipide führten zu einer Zytokinfreisetzung in humanen und murinen Makrophagen in Abhängigkeit von LBP, CD14 und TLR2.

Diese Daten belegen die Existenz von Glykolipiden in Treponemen, die eng verwandt mit LTA Gram-positiver Bakterien sind. Diese Glykolipide sind Liganden des TLR2 und interagieren darüber hinaus, erstmals für eine Substanz jenseits von LPS beschrieben, mit LBP.

### 2.1.2. Biologische Charakteristika von LTA Gram-positiver Bakterien

**N.W.J. Schröder**, S. Morath, C. Alexander, L. Hamann, U. Zähringer, T. Hartung, U. B. Göbel, J. R. Weber, und R. R. Schumann. Lipoteichoic acid (LTA) of *S. pneumoniae* and *S. aureus* activates immune cells via toll-like receptor (TLR)-2, LPS binding protein (LBP) and CD14 while TLR-4 and MD-2 are not involved. *J. Biol. Chem.*, 278: 15587-15594. 2003

In dieser Studie wurde die Interaktion von LTA-Präparationen aus *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* mit humanen Monozyten untersucht. Zuvor waren Daten über die Aktivierung von murinen Makrophagen und humanen HEK293 Zellen veröffentlicht worden, die auf der Verwendung von kommerziellen LTA-Präparationen beruhten und eine Interaktion von LTA mit TLR2 und TLR4 gezeigt hatten. Zusätzlich war MD-2 als Teil des TLR2-Rezeptorkomplexes postuliert worden.

Wir verwendeten durch Butanol-Extraktion und nachfolgende HPLC-Aufreinigung isolierte hochreine LTA-Präparationen von *S. aureus*, sowie eine ebenfalls HPLC-aufgereinigte Präparation von Pneumokokken-LTA, die beide von der Arbeitsgruppe von Prof. T. Hartung, Universität Konstanz, zur Verfügung gestellt wurden.

Beide LTA Präparationen bewirkten eine dosisabhängige Zytokinfreisetzung in humanen Monozyten, die durch Zugabe von Muramyldipeptid, einem Peptidoglykanfragment, gesteigert und durch blockierende anti-CD14-Antikörper gehemmt werden konnte.

Vergleichbar mit den oben beschriebenen Treponemen-Glykolipiden wurde die Zytokinfreisetzung in humanen Monozyten durch LBP verstärkt. Mittels Gelshift-Elektrophorese konnten wir die Bindung beider LTA-Präparationen durch LBP und den Transfer an CD14 belegen. Durch Transfektionsexperimente in HEK293-Zellen und CHO-Zellen konnten wir belegen, dass die zelluläre Aktivierung durch LTA abhängig von TLR2 ist, während ein Einfluss von TLR4 und MD-2 widerlegt werden konnte.

Diese Arbeit definierte mit LBP und CD14 zwei wichtige Interaktionspartner von TLR2. Darüber hinaus konnte eindeutig belegt werden dass TLR2 der zelluläre Rezeptor für LTA ist und weder TLR4 noch MD-2 dabei involviert sind.

### 2.1.3. Biologische Charakteristika von diacylierten und triacylierten Lipopeptiden

**N.W.J. Schröder**, H. Heine, C. Alexander, M. Manukyan, J. Eckert, L. Hamann, U.B Göbel, und R.R. Schumann. Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses. *J. Immunol.* 173: 2683-2691. 2004

In dieser Studie wurden die biologischen Charakteristika von Lipopeptiden, insbesondere ihre Interaktion mit CD14 und LBP untersucht. Lipopeptide mit einem triacylierten Lipidanker, d.h. einem Lipidanker, der drei Fettsäuren enthält, sind synthetische Komponenten, die in u. a. in Spirochäten vorkommenden Lipoproteinen nachempfunden sind. Sie sind starke Immunstimulantien, die eine zelluläre Aktivierung durch Interaktion mit CD14 und TLR2 bewirken. Bezüglich der Interaktion mit TLR2/TLR1- oder TLR2/TLR6-Heterodimeren gab es jedoch widersprüchliche Befunde. Lipopeptide mit zwei Fettsäuren (also diacylierte Lipopeptide) wurden in *Mycoplasma* spp. beschrieben und sind ebenfalls biologisch aktiv, wobei die Aktivierung über TLR2/TLR6-Heterodimere vermittelt wird.

Wir untersuchten die biologischen Charakteristika eines triacylierten Lipopeptids (LP3) und eines diacylierten Lipopeptids (LP2) unter Verwendung von humanen Monozyten, HEK-293 Zellen und CHO-Zellen. Wir konnten zeigen, dass auch in humanen Zellen die Spezifität für die Erkennung von Lipopeptiden durch Bildung von TLR2/TLR1- bzw. TLR2/TLR6-Heterodimeren gewährleistet wird. Außerdem fanden wir, dass die Freisetzung von TNF aus Monozyten im Falle beider Lipopeptide abhängig von CD14 und LBP ist. Die Bindung von Lipopeptiden an CD14 konnte im Gelshift-Assay, die von Lipopeptiden and LBP in Mikroplatten-Bindungsassays nachgewiesen werden. Schließlich konnten wir den Transfer von Fluoreszenz-markierten Lipopeptiden durch LBP auf CD14 unter Verwendung von CHO-Zellen durch FACS-Analyse belegen.

Diese Daten zeigen, dass humane Immunzellen, vergleichbar mit Zellen aus der Maus, triacylierte und diacylierte Lipopeptide über die Bildung von TLR2/TLR1 bzw. TLR2/TLR6-Heterodimeren erkennen können. In beiden Fällen ist CD14 ein Teil des Rezeptorkomplexes. Wie schon für LTA gezeigt, erfolgt auch der Transfer von Lipopeptiden an CD14 durch LBP.

## **2.2. Untersuchungen zur Auswirkung der TLR-vermittelten zellulären Aktivierung in *in vivo* Modellen**

### **2.2.1. Hinweise auf eine Interaktion von TLR2-Liganden mit dem LPS-Bindenden Protein (LBP) in einem Mausmodell der Meningitis**

J.R. Weber, D. Freyer, C. Alexander, **N.W.J. Schröder**, A. Reiss, C. Küster, D. Pfeil, E.I. Tüomanen und R.R. Schumann. Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an expanded, pivotal role for LPS binding protein. *Immunity*, 19: 269-279. 2003

Das LPS Bindende Protein (LBP) ist ein Serumprotein, das LPS an CD14 überträgt und dadurch die zelluläre Aktivierung einleitet. Wie oben beschrieben, konnten wir Hinweise darauf gewinnen, dass Liganden des TLR2 mit LBP interagieren. In dieser Studie wollten wir anhand eines Mausmodells der Pneumokokken-Meningitis, das auf der intrathekalen Verabreichung einer Präparation von Pneumokokken-Zellwänden (PCW) beruht, die Rolle von LBP in der Meningitis sowie die Rolle der Interaktion von LBP mit Gram-positiven Bakterien untersuchen.

Wir konnten beobachten, dass die intrathekale Injektion von PCW eine meningeale Entzündung in Mäusen hervorruft. In LBP-defizienten Mäusen war diese Entzündungsreaktion signifikant geringer ausgeprägt. Die intrathekale Gabe von rekombinantem LBP bewirkte jedoch einen Anstieg der Entzündungsparameter nach Gabe von PCW. PCW bewirkten zudem eine Stimulierung von aus Ratten isolierten meningealen Endothelzellen, die durch Gabe von LBP verstärkt wurde. Durch Transfektionsexperimente in HEK293-Zellen konnte PCW als TLR2-Ligand identifiziert werden, und die Interaktion von PCW mit LBP konnte durch Mikroplatten-Bindungsassays bestätigt werden.

Diese Daten weisen auf eine wichtige Rolle von LBP in der Pathogenese der Meningitis hin. Sie geben darüber hinaus Hinweise darauf, dass die Interaktion von TLR2-Liganden mit LBP eine wichtige Rolle *in vivo* spielt.

## 2.2.2. Auswirkungen des Fehlens von TLR-vermittelter Signaltransduktion in einem Infektionsmodell in der Maus

Y. Naiki, K. S. Michelsen, **N.W.J. Schröder**, R. Alsabeh, A. Slepkin, W. Zhang, S. Chen, B. Wei, Y. Bulut, M.H. Wong, E.M. Peterson, and M. Arditì. MyD88 is Pivotal for the Early Inflammatory Response and Subsequent Bacterial Clearance and Survival in a Mouse Model of *Chlamydia pneumoniae* pneumonia. *J. Biol. Chem.* 280: 29242-29249. 2005

In dieser Studie wurden die Effekte einer MyD88-Defizienz in einem Modell der respiratorischen Infektion von Mäusen mit *Chlamydia pneumoniae* untersucht. Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien die einen einzigartigen Lebenszyklus besitzen, der die Ausbildung von zwei verschiedenen Vegetationsformen einschließt, den infektiösen Elementarkörperchen und den intrazellulären Retikularkörperchen. Die klinisch bedeutsamsten Chlamydien sind *C. trachomatis*, Erreger des Trachoms und von Genitalinfektionen, und *C. pneumoniae*, Erreger von ambulant erworbenen Pneumonien.

Mäuse wurden durch intranasale Injektion mit *C. pneumoniae* infiziert und Entzündungsparameter (zelluläre Infiltration und Zytokine) sowie Bakterien-Zahlen nach 5, 14 und 35 Tagen bestimmt. In Wildtyp-Mäusen führte die Infektion zu maximalen Entzündungszeichen und Erregerzahlen nach 5 Tagen, die nach 14 Tagen signifikant abgesenkt waren und nach 35 Tagen wieder Normalwerte erreichten. Alle untersuchten Mäuse überlebten die Infektion. Im Gegensatz dazu zeigten MyD88-defiziente Mäuse nach 5 Tagen keine Entzündungszeichen. Sie entwickelten jedoch nach 14 Tagen eine schwere Entzündungsreaktion mit ausgeprägten zellulären Infiltraten und hohen Zytokinwerten, die auch nach 35 Tagen kaum abgeschwächt war. Über den gesamten Beobachtungszeitraum waren Chlamydien im Lungengewebe nachweisbar, und etwa 45 % der Mäuse verstarben während der Infektion. Korrespondierend damit konnten wir eine verminderte Zytokinsekretion in Alveolarmakrophagen aus MyD88-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypzellen nach Kontakt mit *C. pneumoniae* nachweisen.

Diese Daten illustrieren die Bedeutung der TLR-vermittelten Signaltransduktion während einer bakteriellen Infektion. Die Abwesenheit von MyD88 führt zu einer verzögerten Immunantwort auf eingedrungene Erreger, der Wirt ist nicht in der Lage die Erreger zu eliminieren und entwickelt eine schwere prolongierte Entzündung mit schwerem klinischem Verlauf, in diesem Falle mit erhöhter Letalität.

## 2.3. Studien zur Auswirkung von TLR-Polymorphismen auf Inzidenz und Verlauf von Infektionskrankheiten

### 2.3.1. Inzidenz und Effekt des Arg753Gln Polymorphismus des humanen TLR2

**N.W.J. Schröder**, C. Hermann, L. Hamann, U. B. Göbel, T. Hartung, und R. R. Schumann. High Frequency of Polymorphism Arg753Gln of the Toll-like Receptor-2 (TLR-2) Gene Detected by A Novel Allele Specific PCR. *J. Mol. Med.*, 81: 368-372. 2003

Für TLR2 wurden zwei Polymorphismen beschrieben, die die Aminosäure-Sequenz innerhalb der TIR-Domäne verändern. Der Polymorphismus Arg753Gln fand sich dabei in 3 von 110 untersuchten gesunden Kaukasiern (2,7 %) sowie in 2 von 91 Patienten, die an einer Sepsis erkrankt waren. Ein weiterer Polymorphismus (Arg677Trp) wurde in Koreanischen Patienten, die an lepromatöser Lepra erkrankt waren, beschrieben.

In dieser Studie untersuchten wir die Frequenz beider Polymorphismen, Arg753Gln und Arg677Trp innerhalb einer Population von 319 gesunden Kaukasiern (162 weiblich, 158 männlich) mittels PCR und Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus. Zusätzlich führten wir Transfektionsexperimente in CHO-Zellen mit Plasmiden, die für Wildtyp-TLR2 sowie für TLR2Arg753Gln und TLR2Arg677Trp kodieren, durch.

Wir konnten zeigen, dass 30 der untersuchten 319 Probanden (9,4 %) heterozygote Träger des Polymorphismus Arg753Gln waren, während die Variante Arg677Trp nicht gefunden wurde. Homozygote Träger von Arg753Gln wurden nicht gefunden. Nach Expression von Wildtyp-TLR2 führte die Inkubation von CHO-Zellen mit triacylierten und diacylierten Lipopeptiden zu einer gesteigerten Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Promotors, was nach Transfektion mit TLR2Arg753Gln nicht der Fall war.

Diese Daten zeigen, dass eine Variante von TLR2, die eine verminderte Aktivierbarkeit durch Liganden von TLR2/TLR1 und TLR2/TLR6-Heterodimeren verursacht, in beinahe 10 % der Bevölkerung zu finden ist.

### 2.3.2. Auswirkungen des Asp299Gly und Thr399Ile Polymorphismus des TLR4-Gens auf die Inzidenz der Parodontitis

**N.W.J. Schröder**, D. Meister, V. Wolff, C. Christan, D. Kaner, V. Haban, P. Purucker, C. Hermann, A. Mötter, U.B. Göbel, and R.R. Schumann. Chronic Periodontal Disease is Associated with Single-Nucleotide Polymorphisms of the Human TLR-4 Gene. *Genes Immun.* 6: 448-451. 2005.

Die Parodontitis ist eine chronische entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparats, die zum Zahnverlust führen kann. Man unterscheidet eine chronische Verlaufsform, die meist bei älteren Patienten auftritt und erst relativ spät zum Zahnverlust führt (chronische P., CP) von einer aggressiven Form, die akut verläuft und im Alter von unter 40 Jahren auftritt (aggressive P., AP). Pathogenetisch wird eine durch Bakterien verursachte Entzündung verantwortlich gemacht, als relevant gelten dabei insbesondere Gram-negative anaerobe Bakterien wie *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* sowie *Acinetobacter actinomycetemcomitans*. Die Tatsache, dass diese Bakterien LPS ausbilden und dieses mit TLR4 interagiert, legt die Vermutung nahe, dass die Entstehung der Parodontitis durch genetische Varianten, die die zelluläre Aktivierung durch TLR4 hemmen, beeinflusst werden könnte.

Um diese Hypothese zu testen, wurden DNA-Proben von 197 Patienten, die an einer Parodontitis erkrankt waren, auf die Anwesenheit des Asp299Gly/Thr399Ile-SNPs des TLR4 mittels PCR und Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus untersucht. Von diesen Patienten waren 116 an einer CP, 81 Patienten an einer AP erkrankt. Parallel wurden nach Alter, Geschlecht und Raucherstatus gematchte Probanden ohne Nachweis einer Parodontitis untersucht.

Unter den Patienten, die an einer CP erkrankt waren, fand sich eine signifikant erhöhte Zahl von Individuen, die heterozygot für den untersuchten Polymorphismus waren (Odd's ratio 3,650, 95% KI 1,573-8,467,  $p \leq 0,0001$ ). Dieser Befund konnte mit Hilfe einer zusätzlichen Kontrollgruppe von Probanden, die älter als 60 Jahre alt waren und keinerlei Zeichen einer Parodontalerkrankung aufwiesen, bestätigt werden. Im Gegensatz dazu fanden wir keine Assoziation des untersuchten Polymorphismus mit dem Vorliegen einer AP.

Diese Daten weisen darauf hin, dass genetische Variationen des TLR4 einen Risikofaktor für die Entstehung einer chronischen Parodontitis darstellen.

### 2.3.3. Der Arg753Gln Polymorphismus des humanen TLR2 vermindert die zelluläre Aktivierung durch *Borrelia burgdorferi* und schützt vor den Spätstadien der Borreliose

**N.W.J. Schröder**, I. Diterich, A. Zinke, J. Eckert, C. Draing, V. v. Baehr, D. Hassler, S. Priem, K. Hahn, K.S. Michelsen, T. Hartung, G.R. Burmester, U.B. Göbel, C. Hermann, and R.R. Schumann. Heterozygous Arg753Gln Polymorphism of Human TLR-2 Impairs Immune Activation by *Borrelia burgdorferi* and Protects from Late Stage Lyme Disease. *J. Immunol.* 175: 2534-2540. 2005

Die Borreliose ist eine in Stadien verlaufene Infektionskrankheit, die durch *Borrelia burgdorferi* verursacht wird. Nach Monaten bis Jahren kann die Erkrankung in ein Spätstadium übergehen, das klinisch durch Lyme Arthritis (LA) oder Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) charakterisiert sein kann.

*B. burgdorferi* exprimiert Lipoproteine, die TLR2/TLR1 Heterodimere aktivieren können. Übereinstimmend damit konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass TLR2-defiziente Mäuse in ihrer Fähigkeit, die Vermehrung des Erregers einzudämmen, maßgeblich eingeschränkt sind. Basierend darauf wollten wir in dieser Studie untersuchen, ob der Polymorphismus Arg753Gln im heterozygoten Zustand die Aktivierung von Zellen durch Lipoproteine einschränkt und ob, falls dies der Fall ist, das Vorhandensein dieser Variante mit der Inzidenz der Borreliose korreliert.

Wir untersuchten die Zytokinfreisetzung im Vollblut nach Stimulation mit Borrelien-Lysaten von Probanden, die als heterozygot für TLR2Arg753Gln getestet wurden, im Vergleich zu Kontroll-Probanden ohne diese Variante. Vollblut von Trägern des SNPs zeigte dabei eine signifikant niedrigere TNF und IFN- $\gamma$  Freisetzung im Vergleich zu Kontrollen. Wir untersuchten den Effekt dieser Variante zusätzlich in einem Transfektionssystem und fanden eine Einschränkung der Aktivierbarkeit durch triacylierte, nicht aber durch diacylierte Lipopeptide wenn diese Zellen mit TLR2-Wildyp und TLR2-Arg753Gln gleichzeitig aktiviert wurden. Innerhalb einer Population von 155 Kaukasiern, die an einer Borreliose erkrankt waren, fanden sich unter den 88 Erkrankten mit LA oder ACA nur 2 Träger von Arg753Gln gegenüber 11 in der Kontrollpopulation (Odd's ratio 0,163, 95% KI 0,04-0,76,  $p \leq 0.0179$ ).

Diese Daten weisen darauf hin, dass eine genetische Variante von TLR2 die die zelluläre Aktivierung durch *B. burgdorferi* beeinträchtigt, vor den Symptomen einer chronischen Infektion mit *B. burgdorferi* schützt.

### 3. Diskussion

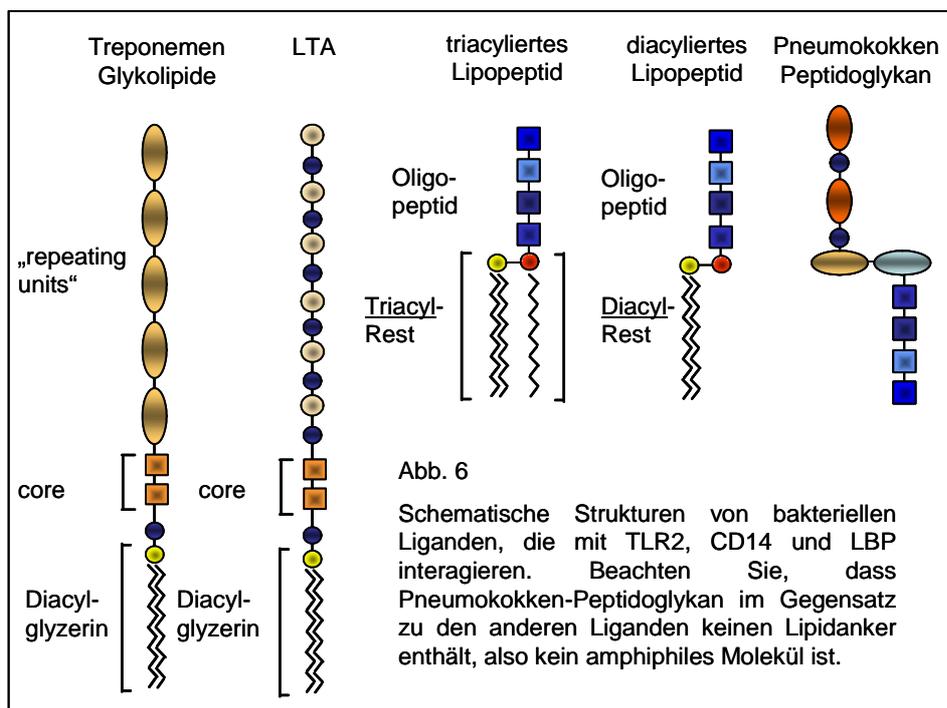
#### 3.1. Chemische und biologische Charakteristika von bakteriellen TLR-Liganden

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten konnten wir sowohl neue TLR2-Liganden chemisch und biologisch charakterisieren als auch biologische Charakteristika von bereits bekannten TLR2-Liganden näher beschreiben. Die Untersuchungen an Treponemen (2.1.1.) wurden zu einem Zeitpunkt begonnen, als TLRs noch nicht als Komponenten der Angeborenen Immunität bekannt waren und hatten in erster Linie zum Ziel chemische und biologische Charakteristika von Treponemen-Glykolipiden aufzuklären.

Im Vorfeld war über Jahrzehnte wiederholt hinweg die Existenz von LPS in Treponemen, darunter *T. pallidum*, beschrieben worden (Jackson and Zey 1973; Petersen 1986), obgleich eine Analyse des Genoms von *T. pallidum* keinen Hinweis auf die Existenz von LPS-Synthese-Genen ergab (Fraser et al. 1998). Unsere Daten konnten eindeutig belegen, dass die Glykolipide aus beiden untersuchten Treponemen-Stämme nicht mit LPS identisch sind, da sie weder Kdo und Heptose noch  $\beta$ -hydroxy-Fettsäuren enthielten, die in sämtlichen bisher beschriebenen LPS-Formen vorkommen. Im Falle von *T. maltophilum* konnten wir zeigen, dass das isolierte Glykolipid einen Diacylglycerin-Lipidanker sowie eine aus 2 Kohlenhydraten bestehende "core"-Region enthält und damit eine enge strukturelle Verwandtschaft mit LTA Gram-positiver Bakterien besteht (Fischer et al. 1980; Schröder et al. 2000, Abb. 3). Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Mengen an Glykolipid von *T. brennaborensis* war eine genaue Analyse dieser Struktur nicht möglich, aufgrund des oben angesprochenen Fehlens von LPS-typischen Komponenten kann jedoch ebenfalls das Vorliegen eines Diacylglycerin-Lipidankers postuliert werden. Im Gegensatz zu LTA aus *S. aureus*, deren hydrophiler Anteil sogenannte "repeating units" aus Polyglyzerinphosphat enthält, fanden wir Hinweise auf das Vorliegen von repeating units, die im Falle von *T. brennaborensis* aus 5, im Falle von *T. maltophilum* aus 20-30 Kohlenhydrat-Einheiten bestehen (Schröder et al. 2000).

Zwischenzeitlich konnte von einer anderen Arbeitsgruppe ein Glykolipid aus *T. medium* isoliert und das Vorliegen von Kohlenhydrat-haltigen repeating units in dieser

Struktur bestätigt werden (Hashimoto et al. 2003). Diese Glykolipide sind Innerhalb der Ordnung der *Spirochaetales* einzigartig für die Gattung *Treponema*. Im Rahmen nachfolgender Studien an verschiedenen Spezies der Gattung *Borrelia* konnten wir sowie eine andere Arbeitsgruppe zeigen, dass diese Bakterien keine komplexen höhermolekularen Glykolipide, sondern auf Galaktose basierende niedrigmolekulare Glykolipide besitzen (Schröder et al 2003; Ben-Menachem et al. 2003). Einige Zeit davor wurde die Existenz von LPS in *Leptospira interrogans* beschrieben (Werts et al. 2001).



Wir konnten weiterhin belegen, dass beide Glykolipide Immunzellen über TLR2 aktivieren können, und dass diese Aktivierung in Abhängigkeit von CD14 und LBP zustande kommt (Schröder et al. 2000; Opitz

et al. 2001; Schröder et al. 2001). Eine Bindung von LTA an CD14 und LBP war im Vorfeld beschrieben worden, der Einfluss auf die Zytokininduktion blieb jedoch unklar (Fan et al. 1999). Durch unsere Untersuchungen konnte somit erstmals nachgewiesen werden, dass LBP außer LPS auch andere Glykolipide binden, an CD14 transferieren und dadurch deren inflammatorische Aktivität steigern kann. In nachfolgenden Studien konnten wir zeigen, dass dies nicht nur für Treponemen-Glykolipide, sondern auch für LTA aus *S. aureus* und *S. pneumoniae* sowie auf Lipoproteine und Lipopeptide und auf Peptidoglykan-Fragmente zutrifft (Schröder et al. 2003; Weber et al. 2003; Schröder et al. 2004). Die Interaktion von LTA und Lipoproteinen mit LBP konnte zwischenzeitlich durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden (Mueller et al. 2006; Gutschmann et al. 2007). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Interaktion von LTA und Lipoproteinen/Lipopeptiden mit LBP Spezies-spezifisch ist: in nachfol-

genden Untersuchungen stellte sich heraus, dass murines, im Gegensatz zu humanen LBP, nicht an LTA oder Lipoproteine binden kann (Schröder et al. 2008). Eine Ausnahme bildet in diesem Zusammenhang Peptidoglykan, dessen Bindung an murines LBP *in vitro* gezeigt werden konnte (Weber et al. 2003). Diese Studie konnte auch belegen, dass die Bindung von TLR2-Liganden an LBP Folgen für die inflammatorische Reaktion des Wirts hat, da die Injektion von Peptidoglykan-Präparationen - in Anwesenheit von LBP - eine Meningitis auslösen konnte. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Abwesenheit von LBP in der Maus eine erhöhte Letalität durch bakterielle Infektionen bewirkt (Jack et al. 1997), lässt sich postulieren, dass die Interaktion von TLR2-Liganden mit LBP eine wichtige Rolle in der Immunabwehr spielt.

Unsere Untersuchungen an bakteriellen Komponenten und deren Interaktion mit TLRs konnten sowohl, in Form von Treponemen-Glykolipiden, neue Liganden für TLR2 definieren als auch offene Fragen bezüglich der Interaktion von bekannten bakteriellen amphiphilen Molekülen mit TLRs klären. So konnten wir eindeutig nachweisen, dass LTA mit TLR2 interagiert und nicht, wie vorher behauptet, mit TLR4 (Takeuchi et al. 1999; Schröder et al. 2003). Außerdem konnten wir eindeutig widerlegen, dass MD-2, wie im Vorfeld postuliert (Dziarski et al. 2001), ein Teil des TLR2-Rezeptorkomplexes ist. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass Lipoproteine mit humanen TLR2/TLR1 Heterodimeren interagieren und es damit keinen Hinweis auf Spezies-spezifische Unterschiede gibt.

### **3.2. Einfluss der TLR-vermittelten Signaltransduktion auf die Immunantwort**

Mittlerweile gibt es eine ganze Reihe von Hinweisen, dass die Erkennung von TLR-Liganden durch das Immunsystem eine wichtige Rolle in der Infektabwehr spielt. So konnte in Mausmodellen von Infektionskrankheiten mit bakteriellen Erregern wie *S. aureus*, *S. pneumoniae* sowie, wie hier aufgeführt, *C. pneumoniae* gezeigt werden, dass die Abwesenheit von TLR-induzierter Signaltransduktion eine erhöhte Letalität und erhöhte Bakterienzahlen bewirkt (Takeuchi et al. 2000; Koedel et al. 2004; Naiki et al. 2005). Dabei ist hervorzuheben, dass es in Abwesenheit von MyD88 durchaus zu einer schweren Entzündungsreaktion kommen kann; diese tritt jedoch verspätet auf, und der Wirt ist womöglich deshalb nicht in der Lage, die Infektion erfolgreich zu

bekämpfen. Welche Mechanismen diese MyD88-unabhängige Entzündungsreaktion bewirken ist im Einzelfall noch nicht geklärt. Es ist jedoch möglich, dass die durch TRIF vermittelte Signaltransduktion nach Aktivierung von TLR4 eine Rolle spielen könnte.

Ein weiterer Aspekt ist die Frage, inwiefern die MyD88-abhängige Signaltransduktion während des akuten Infektionsgeschehens Einflüsse auf die adaptive Immunität hat. Untersuchungen mit Immunisierung von Mäusen in Anwesenheit von LPS kamen zu dem Ergebnis, dass die Aktivierung von MyD88 zur Ausbildung sowohl von Antigen-spezifischen T-Zellen als auch von Immunglobulinen notwendig ist (Pasare and Medzhitov 2004). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es nach Infektion von MyD88-defizienten Mäusen mit *B. burgdorferi* oder *C. pneumoniae* durchaus zur Synthese von Erreger-spezifischen Antikörpern kommt (Bolz et al. 2004; Naiki et al. 2005). Darüber hinaus bildeten MyD88-defiziente Mäuse eine schützende Immunantwort gegen *Mycobacterium tuberculosis* aus (Fremond et al. 2004). Zusammengefasst weisen diese Daten darauf hin, dass die Abwesenheit von TLR-vermittelter Signaltransduktion keinen Einfluss auf die Erreger-spezifische adaptive Immunantwort hat.

Im Gegensatz dazu gibt es allerdings Hinweise darauf, dass nach Stimulation von TLRs im Kontext von Autoimmunerkrankungen und allergischen Erkrankungen durchaus eine Antigen-spezifische Immunantwort ausgelöst werden kann. So konnte gezeigt werden, dass es nach intranasaler Applikation von LPS gemeinsam mit Ovalbumin in Mäusen zu Ausbildung einer allergischen Reaktion nach erneuter Ovalbumin-Exposition kommt (Eisenbarth et al. 2002). Diese Reaktion ist mit der Ausbildung von Ovalbumin-spezifischen IgE-Antikörpern sowie mit der Ausbildung von Ovalbumin-spezifischen Th2-gerichteten T-Zellen verbunden und kommt in Abhängigkeit von MyD88 zustande (Eisenbarth et al. 2002; Piggott et al. 2005). In einem Modell der Antigensensibilisierung im Kontext einer Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* konnten wir zeigen, dass auch ein infektiöses Geschehen in Abhängigkeit von MyD88 die Bildung von Antikörpern und spezifischen T-Zellen gegen ein parallel verabreichtes Antigen, in diesem Fall humanes Serum Albumin, hervorrufen kann (Schröder et al. 2008). Es kommt jedoch nicht in jedem Fall zur Ausbildung einer Th2-gerichteten Immunität, ob es zu einer allergischen Reaktion nach Antigen-Provokation kommt, ist vielmehr von der Dosis des TLR-Liganden bzw. des infektiö-

sen Agens abhängig, wobei niedrige Dosen die Immunantwort in Richtung einer Th2-gerichteten Reaktion verstärken (Eisenbarth et al. 2002; Schröder et al. 2008). Daraus folgt, dass die Aktivierung von TLRs die Ausbildung sowohl von Th1- als auch von Th2-gerichteten Immunantworten gegenüber parallel verabreichtes Antigen auslösen kann. Übereinstimmend damit konnte kürzlich anhand eines Mausmodells der Multiplen Sklerose, dass auf der Applikation von Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)-Peptiden in Anwesenheit von Complete Freund's Adjuvant beruht, die Ausbildung einer ZNS-Pathologie in Abhängigkeit von MyD88 beobachtet werden (Prinz et al. 2006).

### **3.3. Einfluss von TLR-Polymorphismen auf Inzidenz und Verlauf von Krankheiten**

Unsere Untersuchungen zum Einfluss der Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile des humanen TLR4 auf die Inzidenz von Parodontalerkrankungen weisen auf einen Einfluss dieser Variante auf die Entstehung der Chronischen Parodontitis (CP) hin (Schröder et al. 2005). Sowohl pulmonale als auch gingivale Epithelzellen von Probanden, die diese Variante besitzen, weisen eine verminderte Zytokinfreisetzung nach Stimulation mit LPS auf (Arbour et al. 2000) (Kinane et al. 2006). Aufgrund der Tatsache, dass es in Mäusen in Abwesenheit von TLR-vermittelter Signaltransduktion zu einer prolongierten Infektion mit höheren Bakterienzahlen kommt (Naiki et al. 2005), lässt sich deshalb die Hypothese aufstellen, dass Individuen, die die oben angesprochene TLR-Variante besitzen, eine verminderte Abwehrreaktion gegen LPS-ausbildende Parodontalkeime besitzen, was die Besiedelung und eventuelle Infektion des parodontalen Gewebes erleichtert. Unsere Daten zeigen keine Assoziation der besagten Polymorphismen mit der Aggressiven Verlaufsform der Parodontitis (AP). Dies kann durch die geringere Zahl an Probanden bedingt sein, es ist jedoch wahrscheinlich, dass bei dieser akut verlaufenden Erkrankungen andere, bisher nicht identifizierte Mechanismen eine Rolle spielen und die bakteriellen Besiedlung oder Infektion im Hintergrund rückt. Unsere Ergebnisse konnten durch Untersuchungen an einem japanischen Patientenkollektiv bestätigt werden (Fukusaki et al. 2007), andere Untersucher fanden jedoch keine Assoziation (Folwaczny et al. 2004; Berdeli et al. 2007). Aufgrund dessen sind in Zukunft insbesondere auch prospektive Studien an

größeren Patientenkollektiven notwendig, um den Einfluss von TLR-Polymorphismen auf den Verlauf dieser Erkrankung näher zu untersuchen.

Wir konnten zeigen, dass etwa 10 Prozent einer Population von 319 Kaukasiern heterozygote Träger der Variante Arg753Gln des humanen TLR2 sind (Schröder et al. 2003). Den im Vorfeld beschriebenen Polymorphismus Arg677Trp, der in einer Koreanischen Population gefunden wurde und ebenfalls Auswirkungen auf die Signaltransduktion hat (Kang and Chae 2001; Bochud et al. 2003), konnten wir nicht nachweisen. Allerdings wurde die Existenz dieser Variante mittlerweile in Frage gestellt (Malhotra et al. 2005). Untersuchungen an Vollblut von Probanden zeigten, dass es nach Stimulation mit Borrelien-Extrakten, die Lipoproteine enthalten und damit eine Aktivierung von TLR2/TLR1-Heterodimeren bewirken, zu einer abgeschwächten Freisetzung von TNF und IFN- $\gamma$  bei Anwesenheit dieser Variante kommt (Schröder et al. 2005). Im Gegensatz dazu zeigten sich nach Stimulation von Vollblut mit LTA, welche mit TLR2/TLR6-Heterodimeren interagiert (Henneke et al. 2005), keine Unterschiede (von Aulock et al. 2004; Schröder et al. 2005). Wir konnten diese Divergenz durch Überexpression von Arg753Gln-TLR2 in HEK293 Zellen und nachfolgender Stimulation mit triacylierten und diacylierten Lipopeptiden, die mit TLR2/TLR1- bzw. TLR2/TLR6-Heterodimeren interagieren, bestätigen (Schröder et al. 2004). Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass die Variante Arg753Gln des TLR2 zu einer verminderten Formation von TLR2/TLR1-Heterodimeren oder einer verminderten Aktivierbarkeit derselben führt. Basierend auf diesen Beobachtungen und auf Berichten über eine eingeschränkte Immunabwehr in TLR2-defizienten Mäusen nach Infektion mit *B. burgdorferi* (Wang et al. 2004) untersuchten wir die mögliche Assoziation von Arg753Gln mit der Inzidenz der Borreliose. Der Befund, dass Patienten die an einem Spätstadium der Borreliose, der Lyme Arthritis oder der Acrodermatitis chronica atrophicans, erkrankt waren, eine signifikant erniedrigte Frequenz dieser Variante im Vergleich zur Kontrollpopulation aufwiesen (Schröder et al. 2005) deutet auf einen schützenden Einfluss des Polymorphismus hin.

Dies erscheint zunächst im Widerspruch zu den publizierten Daten im Mausmodell zu stehen, wo TLR-defiziente Mäuse höhere Bakterienzahlen aufwiesen (Wang et al. 2004). In diesem Zusammenhang muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass das Mausmodell der Borreliose ein Äquivalent der frühen disseminierten Infektion

darstellt und die Spätformen der Erkrankung nicht oder nur unvollkommen abbildet (Wooten and Weis 2001). Im Gegensatz zu den frühen Erkrankungsstadien, deren Symptomatik durch eine Interaktion von Borrelien mit dem Immunsystem hervorgerufen wird, wird davon ausgegangen, dass die Spätstadien in erster Linie durch Borrelien-spezifische T-Zellen hervorgerufen werden (Steere 2001; Wooten and Weis 2001). Aufgrund dessen ist es denkbar, dass es in der Frühphase der Infektion durch die verminderte zelluläre Aktivierung in Anwesenheit von Arg753Gln zu einer geringeren Bildung von Borrelien-spezifischen T-Zellen kommt, wodurch wiederum die Ausbildung von reaktiven Spätstadien der Erkrankung abgemildert wird. Dieses Szenario ist insbesondere im Hinblick auf die oben genannten Einflüsse der TLR-vermittelten Signaltransduktion auf die adaptive Immunität im Kontext von Autoimmunerkrankungen denkbar. Diese Hypothese wird durch eine Studie gestützt, die eine verminderte Reaktion auf eine Borrelien-Vakzine in Individuen, die eine verminderte Expression von TLR1 und/oder TLR2 aufwiesen, beschrieb (Alexopoulou et al. 2002). Interessanterweise wurde in einer Studie, die den Einfluss von Arg753Gln auf die Inzidenz des Rheumatischen Fiebers untersuchte, ebenfalls eine niedrigere Frequenz in der erkrankten Population im Vergleich zu der Kontrollgruppe gefunden (Berdeli et al. 2005), was eine mögliche Verbindung von TLR2-SNPs und Autoimmunerkrankungen unterstützt.

### **3.4. Ausblick**

In den vergangenen zehn Jahren seit Entdeckung der Rolle von Toll-like Rezeptoren in der Immunabwehr konnte eine Reihe von wesentlichen Fragen bezüglich deren Funktion geklärt werden. Unter anderem konnten die Liganden von TLR1-9 eindeutig identifiziert werden. Zu Anfang bestehende Unklarheiten bezüglich der Liganden sowie des Rezeptorkomplexes von TLR4 und TLR2 konnten aufgeklärt werden. Auch die Mechanismen der TLR-vermittelten Signaltransduktion, vornehmlich unter Einbeziehung von MyD88 und TRIF, konnten weitgehend aufgeklärt werden. Die Rolle von TLR-vermittelter Signaltransduktion konnte, im Mausmodell, ebenfalls identifiziert werden, und Studien anhand von genetischen Varianten in Patienten weisen ebenfalls auf einen Einfluss von TLRs auf die Infektabwehr hin.

Die in dieser Habilitationsschrift zusammengestellten Ergebnisse beziehen sich zum größten Teil auf die Rolle von TLRs während des Erst-Kontakts mit dem eindringenden Erreger. Darüber hinaus gibt es jedoch auch, wie kurz erwähnt, Hinweise darauf, dass die TLR-vermittelte Signaltransduktion einen wichtigen Einfluss auf die Adaptive Immunantwort ausübt. Aus meiner Sicht liegt deshalb eine der wesentlichen Herausforderungen der nächsten Jahre darin, die Rolle von TLRs in der Entstehung von entzündlichen Erkrankungen weiter aufzuklären, die auf einer fehlgeleiteten adaptiven Immunantwort beruhen. Eine Rolle der TLRs in der Entstehung von Allergien und Autoimmunerkrankungen konnte in einigen Modellen bereits belegt werden, und einige der hier vorgestellten Daten, insbesondere im Zusammenhang mit der Borreliose, weisen ebenfalls darauf hin. Während der nächsten Jahre möchte ich mich deshalb insbesondere mit der Rolle der Angeborenen Immunität im Kontext von allergischen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen beschäftigen. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems, vor allem der Multiplen Sklerose, deren Entstehung und Verlauf bereits im Tiermodell mit der TLR-abhängigen Signaltransduktion in Verbindung gebracht wurde. Darüber hinaus möchte ich auch dazu beitragen, die mögliche Rolle der Angeborenen Immunität in Entstehung und Verlauf von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere des Morbus Alzheimer, aufzuklären. Ich bin davon überzeugt, dass das Verständnis des Einflusses der Angeborenen Immunität im Kontext von entzündlichen Erkrankungen nicht nur dazu beiträgt, die Angeborene Immunität besser zu verstehen, sondern auch wesentliche Rückschlüsse auf die Pathogenese dieser Erkrankungen liefern kann.

## Literaturverzeichnis

Adachi, O., T. Kawai, K. Takeda, M. Matsumoto, H. Tsutsui, M. Sakagami, K. Nakanishi and S. Akira (1998). "Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function." *Immunity* 9(1): 143-50.

Agnese, D. M., J. E. Calvano, S. J. Hahm, S. M. Coyle, S. A. Corbett, S. E. Calvano and S. F. Lowry (2002). "Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections." *J Infect Dis* 186(10): 1522-5.

Alexander, C. and E. T. Rietschel (2001). "Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity." *J Endotoxin Res* 7(3): 167-202.

Alexopoulou, L., V. Thomas, M. Schnare, Y. Lobet, J. Anguita, R. T. Schoen, R. Medzhitov, E. Fikrig and R. A. Flavell (2002). "Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice." *Nat Med* 8(8): 878-84.

Allison, A. C. (1954). "Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection." *Br Med J* 1(4857): 290-4.

Anderson, K. V., L. Bokla and C. Nusslein-Volhard (1985). "Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product." *Cell* 42(3): 791-8.

Arbour, N. C., E. Lorenz, B. C. Schutte, J. Zabner, J. N. Kline, M. Jones, K. Frees, J. L. Watt and D. A. Schwartz (2000). "TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans." *Nat Genet* 25(2): 187-91.

Archer, K. A. and C. R. Roy (2006). "MyD88-dependent responses involving toll-like receptor 2 are important for protection and clearance of *Legionella pneumophila* in a mouse model of Legionnaires' disease." *Infect Immun* 74(6): 3325-33.

Ben-Menachem, G., J. Kubler-Kielb, B. Coxon, A. Yergey and R. Schneerson (2003). "A newly discovered cholesteryl galactoside from *Borrelia burgdorferi*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(13): 7913-8.

Berdeli, A., H. A. Celik, R. Ozyurek, B. Dogrusoz and H. H. Aydin (2005). "TLR-2 gene Arg753Gln polymorphism is strongly associated with acute rheumatic fever in children." *J Mol Med* 83(7): 535-41.

Berdeli, A., G. Emingil, B. Han Saygan, A. Gurkan, G. Atilla, T. Kose and H. Baylas (2007). "TLR2 Arg753Gly, TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile gene polymorphisms are not associated with chronic periodontitis in a Turkish population." *J Clin Periodontol* 34(7): 551-7.

Beutler, B. (2004). "Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling." *Nature* 430(6996): 257-63.

Beutler, B. and E. T. Rietschel (2003). "Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin." *Nat Rev Immunol* 3(2): 169-76.

Bochud, P. Y., T. R. Hawn and A. Aderem (2003). "Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling." *J Immunol* 170(7): 3451-4.

Bolz, D. D., R. S. Sundsbak, Y. Ma, S. Akira, C. J. Kirschning, J. F. Zachary, J. H. Weis and J. J. Weis (2004). "MyD88 plays a unique role in host defense but not arthritis development in Lyme disease." *J Immunol* 173(3): 2003-10.

Bulut, Y., E. Faure, L. Thomas, O. Equils and M. Arditi (2001). "Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling." *J Immunol* 167(2): 987-94.

Chow, J. C., D. W. Young, D. T. Golenbock, W. J. Christ and F. Gusovsky (1999). "Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction." *J Biol Chem* 274(16): 10689-92.

Dziarski, R., Q. Wang, K. Miyake, C. J. Kirschning and D. Gupta (2001). "MD-2 enables Toll-like receptor 2 (TLR2)-mediated responses to lipopolysaccharide and enhances TLR2-mediated responses to Gram-positive and Gram-negative bacteria and their cell wall components." *J Immunol* 166(3): 1938-44.

Eisenbarth, S. C., D. A. Piggott, J. W. Huleatt, I. Visintin, C. A. Herrick and K. Bottomly (2002). "Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen." *J Exp Med* 196(12): 1645-51.

Fan, X., F. Stelter, R. Menzel, R. Jack, I. Spreitzer, T. Hartung and C. Schutt (1999). "Structures in *Bacillus subtilis* are recognized by CD14 in a lipopolysaccharide binding protein-dependent reaction." *Infect Immun* 67(6): 2964-8.

Fischer, W., H. U. Koch, P. Rosel, F. Fiedler and L. Schmuck (1980). "Structural requirements of lipoteichoic acid carrier for recognition by the poly(ribitol phosphate) polymerase from *Staphylococcus aureus* H. A study of various lipoteichoic acids, derivatives, and related compounds." *J Biol Chem* 255(10): 4550-6.

Folwaczny, M., J. Glas, H. P. Torok, O. Limbersky and C. Folwaczny (2004). "Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 mutations in periodontal disease." *Clin Exp Immunol* 135(2): 330-5.

Fraser, C. M., S. J. Norris, G. M. Weinstock, O. White, G. G. Sutton, R. Dodson, M. Gwinn, E. K. Hickey, R. Clayton, K. A. Ketchum, E. Sodergren, J. M. Hardham, M. P. McLeod, S. Salzberg, J. Peterson, H. Khalak, D. Richardson, J. K. Howell, M.

Chidambaram, T. Utterback, L. McDonald, P. Artiach, C. Bowman, M. D. Cotton, C. Fujii, S. Garland, B. Hatch, K. Horst, K. Roberts, M. Sandusky, J. Weidman, H. O. Smith and J. C. Venter (1998). "Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete." *Science* 281(5375): 375-88.

Fremont, C. M., V. Yermeev, D. M. Nicolle, M. Jacobs, V. F. Quesniaux and B. Ryffel (2004). "Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88." *J Clin Invest* 114(12): 1790-9.

Fukusaki, T., N. Ohara, Y. Hara, A. Yoshimura and K. Yoshiura (2007). "Evidence for association between a Toll-like receptor 4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population." *J Periodontal Res* 42(6): 541-5.

Galanos, C., O. Luderitz, E. T. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, M. Freudenberg, U. Schade, M. Imoto, H. Yoshimura and et al. (1985). "Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities." *Eur J Biochem* 148(1): 1-5.

Garcia, J., B. Lemercier, S. Roman-Roman and G. Rawadi (1998). "A *Mycoplasma fermentans*-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF-kappaB activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways." *J Biol Chem* 273(51): 34391-8.

Gutsmann, T., A. B. Schromm and K. Brandenburg (2007). "The physicochemistry of endotoxins in relation to bioactivity." *Int J Med Microbiol* 297(5): 341-52.

Hagberg, L., R. Hull, S. Hull, J. R. McGhee, S. M. Michalek and C. Svanborg Eden (1984). "Difference in susceptibility to gram-negative urinary tract infection between C3H/HeJ and C3H/HeN mice." *Infect Immun* 46(3): 839-44.

Hashimoto, M., Y. Asai, T. Jinno, S. Adachi, S. Kusumoto and T. Ogawa (2003). "Structural elucidation of polysaccharide part of glycoconjugate from *Treponema medium* ATCC 700293." *Eur J Biochem* 270(12): 2671-9.

Hawn, T. R., A. Verbon, K. D. Lettinga, L. P. Zhao, S. S. Li, R. J. Laws, S. J. Skerrett, B. Beutler, L. Schroeder, A. Nachman, A. Ozinsky, K. D. Smith and A. Aderem (2003). "A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease." *J Exp Med* 198(10): 1563-72.

Henneke, P., S. Morath, S. Uematsu, S. Weichert, M. Pfitzenmaier, O. Takeuchi, A. Muller, C. Poyart, S. Akira, R. Berner, G. Teti, A. Geyer, T. Hartung, P. Trieu-Cuot, D. L. Kasper and D. T. Golenbock (2005). "Role of lipoteichoic acid in the phagocyte response to group B streptococcus." *J Immunol* 174(10): 6449-55.

Heppner, G. and D. W. Weiss (1965). "High Susceptibility of Strain A Mice to Endotoxin and Endotoxin-Red Blood Cell Mixtures." *J Bacteriol* 90(3): 696-703.

Hirschfeld, M., Y. Ma, J. H. Weis, S. N. Vogel and J. J. Weis (2000). "Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2." *J Immunol* 165(2): 618-22.

Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabet, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han and B. Beutler (2003). "Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling." *Nature* 424(6950): 743-8.

Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda and S. Akira (1999). "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product." *J Immunol* 162(7): 3749-52.

Jack, R. S., X. Fan, M. Bernheiden, G. Rune, M. Ehlers, A. Weber, G. Kirsch, R. Mentel, B. Füll, M. Freudenberg, G. Schmitz, F. Stelter and C. Schutt (1997). "Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection." *Nature* 389(6652): 742-5.

Jackson, S. W. and P. N. Zey (1973). "Ultrastructure of lipopolysaccharide isolated from *Treponema pallidum*." *J Bacteriol* 114(2): 838-44.

Kaisho, T., K. Hoshino, T. Iwabe, O. Takeuchi, T. Yasui and S. Akira (2002). "Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support T(h)2 cell differentiation." *Int Immunol* 14(7): 695-700.

Kang, T. J. and G. T. Chae (2001). "Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients." *FEMS Immunol Med Microbiol* 31(1): 53-8.

Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira (1999). "Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin." *Immunity* 11(1): 115-22.

Kawai, T. and S. Akira (2007). "TLR signaling." *Semin Immunol* 19(1): 24-32.

Kinane, D. F., H. Shiba, P. G. Stathopoulou, H. Zhao, D. F. Lappin, A. Singh, M. A. Eskin, S. Beckers, S. Waigel, B. Alpert and T. B. Knudsen (2006). "Gingival epithelial cells heterozygous for Toll-like receptor 4 polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile are hypo-responsive to *Porphyromonas gingivalis*." *Genes Immun* 7(3): 190-200.

Kirschning, C. J., H. Wesche, T. Merrill Ayres and M. Rothe (1998). "Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide." *J Exp Med* 188(11): 2091-7.

Koedel, U., T. Rupprecht, B. Angele, J. Heesemann, H. Wagner, H. W. Pfister and C. J. Kirschning (2004). "MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS." *Brain* 127(Pt 6): 1437-45.

- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." *Cell* 86(6): 973-83.
- Lien, E., T. J. Sellati, A. Yoshimura, T. H. Flo, G. Rawadi, R. W. Finberg, J. D. Carroll, T. Espevik, R. R. Ingalls, J. D. Radolf and D. T. Golenbock (1999). "Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products." *J Biol Chem* 274(47): 33419-25.
- Linehan, S. A., L. Martinez-Pomares and S. Gordon (2000). "Macrophage lectins in host defence." *Microbes Infect* 2(3): 279-88.
- Lorenz, E., J. P. Mira, K. L. Cornish, N. C. Arbour and D. A. Schwartz (2000). "A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection." *Infect Immun* 68(11): 6398-401.
- Lorenz, E., D. A. Schwartz, P. J. Martin, T. Gooley, M. T. Lin, J. W. Chien, J. A. Hansen and J. G. Clark (2001). "Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation." *Biol Blood Marrow Transplant* 7(7): 384-7.
- Malhotra, D., V. Relhan, B. S. Reddy and R. Bamezai (2005). "TLR2 Arg677Trp polymorphism in leprosy: revisited." *Hum Genet* 116(5): 413-5.
- Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." *Science* 296(5566): 301-5.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: the virtues of a non-clonal system of recognition." *Cell* 91(3): 295-8.
- Misch, E. A. and T. R. Hawn (2008). "Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease." *Clin Sci (Lond)* 114(5): 347-60.
- Mitchell, C. R., J. B. Kempton, B. Scott-Tyler and D. R. Trune (1997). "Otitis media incidence and impact on the auditory brain stem response in lipopolysaccharide-nonresponsive C3H/HeJ mice." *Otolaryngol Head Neck Surg* 117(5): 459-64.
- Morath, S., A. Geyer and T. Hartung (2001). "Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*." *J Exp Med* 193(3): 393-7.
- Morath, S., A. Geyer, I. Spreitzer, C. Hermann and T. Hartung (2002). "Structural decomposition and heterogeneity of commercial lipoteichoic Acid preparations." *Infect Immun* 70(2): 938-44.
- Mueller, M., C. Stämme, C. Draing, T. Hartung, U. Seydel and A. B. Schromm (2006). "Cell activation of human macrophages by lipoteichoic acid is strongly attenuated by lipopolysaccharide-binding protein." *J Biol Chem* 281(42): 31448-56.

Naiki, Y., K. S. Michelsen, N. W. Schroder, R. Alsabeh, A. Slepkin, W. Zhang, S. Chen, B. Wei, Y. Bulut, M. H. Wong, E. M. Peterson and M. Arditi (2005). "MyD88 is pivotal for the early inflammatory response and subsequent bacterial clearance and survival in a mouse model of *Chlamydia pneumoniae* pneumonia." *J Biol Chem* 280(32): 29242-9.

Nishiguchi, M., M. Matsumoto, T. Takao, M. Hoshino, Y. Shimonishi, S. Tsuji, N. A. Begum, O. Takeuchi, S. Akira, K. Toyoshima and T. Seya (2001). "*Mycoplasma fermentans* lipoprotein M161Ag-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2: role of N-terminal hydrophobic portion in its multiple functions." *J Immunol* 166(4): 2610-6.

O'Brien, A. D., D. L. Rosenstreich, I. Scher, G. H. Campbell, R. P. MacDermott and S. B. Formal (1980). "Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the LPS gene." *J Immunol* 124(1): 20-4.

O'Neill, L. A. (2002). "Toll-like receptor signal transduction and the tailoring of innate immunity: a role for Mal?" *Trends Immunol* 23(6): 296-300.

Opitz, B., N. W. Schroder, I. Spreitzer, K. S. Michelsen, C. J. Kirschning, W. Hallatschek, U. Zahringer, T. Hartung, U. B. Gobel and R. R. Schumann (2001). "Toll-like receptor-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation." *J Biol Chem* 276(25): 22041-7.

Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder and A. Aderem (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25): 13766-71.

Pasare, C. and R. Medzhitov (2003). "Toll-like receptors: balancing host resistance with immune tolerance." *Curr Opin Immunol* 15(6): 677-82.

Pasare, C. and R. Medzhitov (2004). "Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation." *Immunity* 21(5): 733-41.

Petersen, C. S. (1986). "Isolation and characterization of antigens from *Treponema phagedenis* biotype Reiter cross-reacting with *Treponema pallidum*." *Dan Med Bull* 33(5): 257-65.

Picard, C., A. Puel, M. Bonnet, C. L. Ku, J. Bustamante, K. Yang, C. Soudais, S. Dupuis, J. Feinberg, C. Fieschi, C. Elbim, R. Hitchcock, D. Lammas, G. Davies, A. Al-Ghonaïm, H. Al-Rayes, S. Al-Jumaah, S. Al-Hajjar, I. Z. Al-Mohsen, H. H. Frayha, R. Rucker, T. R. Hawn, A. Aderem, H. Tufenkeji, S. Haraguchi, N. K. Day, R. A. Good, M. A. Gougerot-Pocidalò, A. Ozinsky and J. L. Casanova (2003). "Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency." *Science* 299(5615): 2076-9.

Piggott, D. A., S. C. Eisenbarth, L. Xu, S. L. Constant, J. W. Huleatt, C. A. Herrick and K. Bottomly (2005). "MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen." *J Clin Invest* 115(2): 459-67.

Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton and B. Beutler (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." *Science* 282(5396): 2085-8.

Prinz, M., F. Garbe, H. Schmidt, A. Mildner, I. Gutcher, K. Wolter, M. Piesche, R. Schroers, E. Weiss, C. J. Kirschning, C. D. Rochford, W. Bruck and B. Becher (2006). "Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis." *J Clin Invest* 116(2): 456-64.

Raetz, C. R. and C. Whitfield (2002). "Lipopolysaccharide endotoxins." *Annu Rev Biochem* 71: 635-700.

Rock, F. L., G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein and J. F. Bazan (1998). "A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(2): 588-93.

Schröder, N. W., T. R. Crother, Y. Naiki, S. Chen, M. H. Wong, A. Yilmaz, A. Slepkin, D. Schulte, R. Alsabeh, T. M. Doherty, E. Peterson, A. E. Nel and M. Arditi (2008). "Innate Immune Responses during Bacterial Respiratory Infection Induce Allergic Airway Sensitization." submitted.

Schröder, N. W., I. Diterich, A. Zinke, J. Eckert, C. Draing, V. von Baehr, D. Hassler, S. Priem, K. Hahn, K. S. Michelsen, T. Hartung, G. R. Burmester, U. B. Gobel, C. Hermann and R. R. Schumann (2005). "Heterozygous Arg753Gln polymorphism of human TLR-2 impairs immune activation by *Borrelia burgdorferi* and protects from late stage Lyme disease." *J Immunol* 175(4): 2534-40.

Schröder, N. W., J. Eckert, G. Stübs and R. R. Schumann (2008). "Immune Responses Induced by Spirochetal Outer Membrane Lipoproteins and Glycolipids." *Immunobiology*. 213: 329-340.

Schröder, N. W., H. Heine, C. Alexander, M. Manukyan, J. Eckert, L. Hamann, U. B. Gobel and R. R. Schumann (2004). "Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses." *J Immunol* 173(4): 2683-91.

Schröder, N. W., C. Hermann, L. Hamann, U. B. Gobel, T. Hartung and R. R. Schumann (2003). "High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR." *J Mol Med* 81(6): 368-72.

Schröder, N. W., D. Meister, V. Wolff, C. Christan, D. Kaner, V. Haban, P. Purucker, C. Hermann, A. Moter, U. B. Gobel and R. R. Schumann (2005). "Chronic periodontal disease is associated with single-nucleotide polymorphisms of the human TLR-4 gene." *Genes Immun* 6(5): 448-51.

Schröder, N. W., S. Morath, C. Alexander, L. Hamann, T. Hartung, U. Zahringer, U. B. Gobel, J. R. Weber and R. R. Schumann (2003). "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* 278(18): 15587-94.

Schröder, N. W., B. Opitz, N. Lamping, K. S. Michelsen, U. Zahringer, U. B. Gobel and R. R. Schumann (2000). "Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponema* glycolipids." *J Immunol* 165(5): 2683-93.

Schröder, N. W., D. Pfeil, B. Opitz, K. S. Michelsen, J. Amberger, U. Zahringer, U. B. Gobel and R. R. Schumann (2001). "Activation of mitogen-activated protein kinases p42/44, p38, and stress-activated protein kinases in myelo-monocytic cells by *Treponema* lipoteichoic acid." *J Biol Chem* 276(13): 9713-9.

Schröder, N. W., U. Schombel, H. Heine, U. B. Gobel, U. Zahringer and R. R. Schumann (2003). "Acylated cholesteryl galactoside as a novel immunogenic motif in *Borrelia burgdorferi* sensu stricto." *J Biol Chem* 278(36): 33645-53.

Schröder, N. W. and R. R. Schumann (2005). "Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease." *Lancet Infect Dis* 5(3): 156-64.

Schumann, R. R., S. R. Leong, G. W. Flaggs, P. W. Gray, S. D. Wright, J. C. Mathison, P. S. Tobias and R. J. Ulevitch (1990). "Structure and function of lipopolysaccharide binding protein." *Science* 249(4975): 1429-31.

Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe and C. J. Kirschning (1999). "Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2." *J Biol Chem* 274(25): 17406-9.

Sellati, T. J., D. A. Bouis, R. L. Kitchens, R. P. Darveau, J. Pugin, R. J. Ulevitch, S. C. Gangloff, S. M. Goyert, M. V. Norgard and J. D. Radolf (1998). "*Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytic cells via a CD14-dependent pathway distinct from that used by lipopolysaccharide." *J Immunol* 160(11): 5455-64.

Shi, Y., J. E. Evans and K. L. Rock (2003). "Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells." *Nature* 425(6957): 516-21.

Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake and M. Kimoto (1999). "MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4." *J Exp Med* 189(11): 1777-82.

Sorensen, T. I., G. G. Nielsen, P. K. Andersen and T. W. Teasdale (1988). "Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees." *N Engl J Med* 318(12): 727-32.

Steere, A. C. (2001). "Lyme disease." *N Engl J Med* 345(2): 115-25.

- Taguchi, T., J. L. Mitcham, S. K. Dower, J. E. Sims and J. R. Testa (1996). "Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the *Drosophila* transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14." *Genomics* 32(3): 486-8.
- Takeuchi, O., K. Hoshino and S. Akira (2000). "Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection." *J Immunol* 165(10): 5392-6.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." *Immunity* 11(4): 443-51.
- Takeuchi, O., A. Kaufmann, K. Grote, T. Kawai, K. Hoshino, M. Morr, P. F. Muhlradt and S. Akira (2000). "Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway." *J Immunol* 164(2): 554-7.
- Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda and S. Akira (2001). "Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6." *Int Immunol* 13(7): 933-40.
- Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R. L. Modlin and S. Akira (2002). "Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins." *J Immunol* 169(1): 10-4.
- Tal, G., A. Mandelberg, I. Dalal, K. Cesar, E. Somekh, A. Tal, A. Oron, S. Itskovich, A. Ballin, S. Houry, A. Beigelman, O. Lider, G. Rechavi and N. Amariglio (2004). "Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease." *J Infect Dis* 189(11): 2057-63.
- Tsung, A., J. R. Klune, X. Zhang, G. Jeyabalan, Z. Cao, X. Peng, D. B. Stolz, D. A. Geller, M. R. Rosengart and T. R. Billiar (2007). "HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling." *J Exp Med* 204(12): 2913-23.
- von Aulock, S., N. W. Schroder, S. Traub, K. Gueinzius, E. Lorenz, T. Hartung, R. R. Schumann and C. Hermann (2004). "Heterozygous toll-like receptor 2 polymorphism does not affect lipoteichoic acid-induced chemokine and inflammatory responses." *Infect Immun* 72(3): 1828-31.
- Wang, G., Y. Ma, A. Buyuk, S. McClain, J. J. Weis and I. Schwartz (2004). "Impaired host defense to infection and Toll-like receptor 2-independent killing of *Borrelia burgdorferi* clinical isolates in TLR2-deficient C3H/HeJ mice." *FEMS Microbiol Lett* 231(2): 219-25.
- Watson, J. and R. Riblet (1974). "Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. I. Evidence for a single gene that influences mitogenic and immunogenic responses to lipopolysaccharides." *J Exp Med* 140(5): 1147-61.

Watson, J. and R. Riblet (1975). "Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. II. A gene that influences a membrane component involved in the activation of bone marrow-derived lymphocytes by lipopolysaccharides." *J Immunol* 114(5): 1462-8.

Weber, J. R., D. Freyer, C. Alexander, N. W. Schroder, A. Reiss, C. Kuster, D. Pfeil, E. I. Tuomanen and R. R. Schumann (2003). "Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an expanded, pivotal role for LPS binding protein." *Immunity* 19(2): 269-79.

Werts, C., R. I. Tapping, J. C. Mathison, T. H. Chuang, V. Kravchenko, I. Saint Girons, D. A. Haake, P. J. Godowski, F. Hayashi, A. Ozinsky, D. M. Underhill, C. J. Kirschning, H. Wagner, A. Aderem, P. S. Tobias and R. J. Ulevitch (2001). "*Leptospiral lipopolysaccharide* activates cells through a TLR2-dependent mechanism." *Nat Immunol* 2(4): 346-52.

Woods, J. P., J. A. Frelinger, G. Warrack and J. G. Cannon (1988). "Mouse genetic locus *Lps* influences susceptibility to *Neisseria meningitidis* infection." *Infect Immun* 56(8): 1950-5.

Wooten, R. M. and J. J. Weis (2001). "Host-pathogen interactions promoting inflammatory Lyme arthritis: use of mouse models for dissection of disease processes." *Curr Opin Microbiol* 4(3): 274-9.

Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch and J. C. Mathison (1990). "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein." *Science* 249(4975): 1431-3.

Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda and S. Akira (2003). "Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway." *Science* 301(5633): 640-3.

Yang, R. B., M. R. Mark, A. Gray, A. Huang, M. H. Xie, M. Zhang, A. Goddard, W. I. Wood, A. L. Gurney and P. J. Godowski (1998). "Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling." *Nature* 395(6699): 284-8.

## Liste eigener Veröffentlichungen

### Originalpublikationen mit Erstautorenschaft

- |   | IF    |
|---|-------|
| 1. <b>N.W.J. Schröder</b> , B. Opitz, N. Lamping, K.S. Michelsen, U. Zähringer, U.B. Göbel, und R.R. Schumann<br>Involvement of Lipopolysaccharide Binding Protein, CD14, and Toll-like Receptors in the Initiation of Innate Immune Responses by <i>Treponema</i> Glycolipids. <i>J. Immunol.</i> , 165: 2683-2693. 2000   | 6,834 |
| 2. <b>N.W.J. Schröder</b> , D. Pfeil, B. Opitz, K.S. Michelsen, J. Amberger, U. Zähringer, U.B. Göbel, und R.R. Schumann.<br>Mitogen Activated Protein Kinases p42/44, p38, and Stress Activated Protein Kinases are Involved in Induction of Proinflammatory Cytokines in Myelomonocytic Cells by <i>Treponema</i> Lipoteichoic Acid. <i>J. Biol. Chem.</i> , 276: 9713-9719. 2001                           | 7,258 |
| 3. <b>N.W.J. Schröder</b> , U. Schombel, H. Heine, U.B. Göbel, U. Zähringer, und R.R. Schumann.<br>Acylated Cholesteryl Galactoside as a Novel Immunogenic Motif in <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto. <i>J. Biol. Chem.</i> , 278:33645-53. 2003   | 6,482 |
| 4. <b>N.W.J. Schröder</b> , S. Morath, C. Alexander, L. Hamann, U. Zähringer, T. Hartung, U. B. Göbel, J. R. Weber, und R. R. Schumann.<br>Lipoteichoic acid (LTA) of <i>S. pneumoniae</i> and <i>S. aureus</i> Activates Immune Cells via toll-like receptor (TLR)-2, LPS binding protein (LBP) and CD14 while TLR-4 and MD-2 are not involved. <i>J. Biol. Chem.</i> , 278: 15587-15594. 2003               | 6,482 |
| 5. <b>N.W.J. Schröder</b> , C. Hermann, L. Hamann, U. B. Göbel, T. Hartung, und R. R. Schumann.<br>High Frequency of Polymorphism Arg753Gln of the Toll-like Receptor-2 (TLR-2) Gene Detected by A Novel Allele Specific PCR. <i>J. Mol. Med.</i> , 81: 368-372. 2003   | 4,101 |
| 6. <b>N.W.J. Schröder</b> , H. Heine, C. Alexander, M. Manukyan, J. Eckert, L. Hamann, U.B Göbel, und R.R. Schumann.<br>Lipopolysaccharide Binding Protein Binds to Triacylated and Diacylated Lipopeptides and Mediates Innate Immune Responses. <i>J. Immunol.</i> 173: 2683-2691. 2004   | 6,486 |
| 7. <b>N.W.J. Schröder</b> , D. Meister, V. Wolff, C. Christan, D. Kaner, V. Haban, P. Purucker, C. Hermann, A. Moter, U.B. Göbel, and R.R. Schumann.<br>Chronic Periodontal Disease is Associated with Single-Nucleotide Polymorphisms of the Human TLR-4 Gene. <i>Genes Immun.</i> 6: 448-451. 2005  | 3,779 |
| 8. <b>N.W.J. Schröder</b> , I. Diterich, A. Zinke, J. Eckert, C. Draing, V. v. Baehr, D. Hassler, S. Priem, K. Hahn, K.S. Michelsen, T. Hartung, G.R. Burmester, U.B. Göbel, C. Hermann, and R.R. Schumann.<br>Heterozygous Arg753Gln Polymorphism of Human TLR-2 Impairs Immune Activation by <i>Borrelia burgdorferi</i> and Protects from Late Stage Lyme Disease. <i>J. Immunol.</i> 175: 2534-2540. 2005 | 6,387 |

## Originalpublikationen mit Ko-Autorenschaft

- IF**
1. N. Lamping, R. Dettmer, **N.W.J. Schröder**, D. Pfeil, W. Hallatschek, R. Burger, und R.R. Schumann.  
LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or Gram-negative bacteria. *J. Clin. Invest.*, 101: 2065-2071. 1998 **9,315**
  2. B. Opitz, **N.W.J. Schröder**, I. Spreitzer, K.S. Michelsen, C.J. Kirschning, W. Hallatschek, U. Zähringer, T. Hartung, U.B. Göbel, und R.R. Schumann.  
Toll-like Receptor (TLR)-2 Mediates *Treponema* Glycolipid and Lipoteichoic Acid (LTA)-Induced NF- $\kappa$ B Translocation. *J. Biol. Chem*, 276: 22041-22047. 2001 **7,258**
  3. K. Prass, W. Bruck, **N.W.J. Schröder**, A. Bender, M. Prass, T. Wolf, M.S. Van der Knaap, und R. Zschenderlein.  
Adult-onset Leukoencephalopathy with vanishing white matter presenting with dementia. *Ann. Neurol.* 50: 665-668, 2001 **8,481**
  4. C. Hermann, I. Spreitzer, **N.W.J. Schröder**, S. Morath, M.D. Lehner, W. Fischer, C. Schütt, R.R. Schumann, und T. Hartung.  
Cytokine induction by purified lipoteichoic acids from various bacterial species. Role of LBP, sCD14, CD14 and failure to induce IL-12 and subsequent IFN-gamma release. *Eur. J. Immunol*; 32: 541-551, 2002 **4,832**
  5. J.R. Weber, D. Freyer, C. Alexander, **N.W.J. Schröder**, A. Reiss, C. Küster, D. Pfeil, E.I. Tuomanen und R. R. Schumann.  
Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an expanded, pivotal role for LPS binding protein. *Immunity*, 19: 269-279. 2003 **16,016**
  6. S. von Aulock, **N.W.J. Schröder**, K. Gueinzus, S. Traub, S. Hoffmann, K. Graf, S. Dimmeler, T. Hartung, R.R. Schumann, und C. Hermann.  
Heterozygous toll-like receptor 4 polymorphism does not influence LPS-induced cytokine release in human whole blood. *J. Infect. Dis.* 188: 938-943. 2003 **4,481**
  7. S. von Aulock S, **N.W.J. Schröder**, S. Traub, K. Gueinzus, E. Lorenz, T. Hartung, R.R. Schumann, und C. Hermann.  
Heterozygous toll-like receptor 2 polymorphism does not affect lipoteichoic acid-induced chemokine and inflammatory responses. *Infect. Immun.* 72: 1828-1831. 2002 **4,033**
  8. L. Hamann, A. Gomma, **N.W.J. Schröder**, C. Stamme, C. Glaeser, S. Schulz, M. Gross, S.D. Anker, K. Fox, und R.R. Schumann.  
A frequent Toll-like Receptor (TLR)-2 Polymorphism is a Risk Factor for Coronary Stenosis. *J. Mol. Med.* 83: 478-485. 2005 **4,702**
  9. D. BERPPOHL, A. Halle, D. Freyer, E. Dagand, J.S. Braun, I. Bechmann, **N.W.J. Schröder**, und J.R. Weber.  
Bacterial Programmed Cell Death of Cerebral Endothelial Cells Involves Dual Death Pathways. *J. Clin. Invest.* 115: 1607-1615. 2005 **15,053**

**IF**

10. Y. Naiki, K. S. Michelsen, **N.W.J. Schröder**, R. Alsabeh, A. Slepkin, W. Zhang, S. Chen, B. Wei, Y. Bulut, M.H. Wong, E.M. Peterson, und M. Arditì. MyD88 is Pivotal for the Early Inflammatory Response and Subsequent Bacterial Clearance and Survival in a Mouse Model of *Chlamydia pneumoniae* pneumonia. *J. Biol. Chem.* 280: 29242-29249. 2005 **5,854**
11. F.P. Mockenhaupt, J.P. Cramer, M.S. Stegemann, J. Eckert, L. Hamann, N. Oh, R.N. Otchwemah, E. Dietz, S. Ehrhardt, **N.W.J. Schröder**, U. Bienzle, and R.R. Schumann  
TLR Polymorphisms in African Children: Common TLR-4 Variants Predispose to Severe Malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103: 177-182. 2006 **9,643**
12. A. Yilmaz, A. Rowley, D.J. Schulte, T.M. Doherty, **N.W.J. Schröder**, M.C. Fishbein, M. Kalelkar, I. Cicha, K. Schubert, W.G. Daniel, C.D. Garlachs, and Moshe Arditì.  
Activated myeloid dendritic cells accumulate and co-localize with CD3<sup>+</sup> T cells in coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease. *Exp. Mol. Pathol.* 83: 93-103. 2007. **1,377**

### **Zur Publikation eingereicht**

**N.W.J. Schröder**, T. Crother, Y. Naiki, S. Chen, M. Wong, A. Yilmaz, A. Slepkin, D. Schulte, R. Alsabeh, T.M. Doherty, E. Petersson, A.E. Nel, und M. Arditì.

Innate Immune Responses during Bacterial Respiratory Infection Cause Allergic Airway Sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.*, in Revision

### **In Vorbereitung**

G. Stübs, H. Moll, U. Schombel, V. Fingerle, B. Wilske, U. B. Göbel, U. Zähringer, R. R. Schumann, und **N.W.J. Schröder**

Acylated Cholesteryl Galactosides are Abundant among *Borrelia burgdorferi* sensu lato and are Recognized by Immune Sera of Patients Suffering from Late Stage Lyme Disease.

### **Übersichtsartikel**

1. **N.W.J. Schröder** and R. R. Schumann.  
Single Nucleotide Polymorphisms of Toll-like Receptors and Susceptibility to Infectious Disease. *Lancet Infect. Dis.* 5: 156-164. 2005
2. **N.W.J. Schröder** and R.R. Schumann.  
Non-LPS targets and actions of LPS Binding Protein (LBP). *J. Endotoxin Res.* 11: 237-242. 2005
3. **N.W.J. Schröder** and M. Maurer.  
The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. *Allergy.* 62: 579-590. 2007
4. **N.W.J. Schröder** und M. Arditì.  
The Role of Innate Immunity in the Pathogenesis of Asthma: Evidence for an

Involvement of Toll-like Receptor-Signaling. *J. Endotoxin Res.* 13: 305-312. 2007

5. **N.W.J. Schröder**, J. Eckert, G. Stübs, und R.R. Schumann. Immune Responses Induced bei Spirochetal Outer Membrane Glycolipids and Lipoproteins. *Immunobiology.* 213: 329-340. 2008

### ***Buchkapitel***

1. **N.W.J. Schröder** and R.R. Schumann. Pattern Recognition. In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections 10<sup>th</sup> Edition: Immunology. S.H.E. Kaufmann ed. Edward Arnold Ltd. 2004
2. **N.W.J. Schröder**, R.R. Schumann, and U.B. Göbel. Innate and Adaptive Immune Responses to Oral Treponemes. In: Pathogenic *Treponema*: Molecular and Cellular Biology. J.A. Radolf and S. Lukehart ed. Caister Academic Press 2006

## Danksagung

Der überwiegende Teil der hier aufgeführten Studien ist das Ergebnis meiner Tätigkeit am Labor von Prof. Ralf R. Schumann bzw. wurde im Rahmen späterer Kooperationen mit ihm erarbeitet. Ich möchte mich deshalb in erster Linie bei Prof. Schumann für seine langjährige Unterstützung bedanken. Mein Dank gilt auch Herrn Professor Ulf B. Göbel, an dessen Institut die Arbeiten durchgeführt wurden.

Die Untersuchungen zur chemischen Struktur von bakteriellen Glykolipiden wären ohne die tatkräftige Unterstützung von Prof. Ulrich Zähringer, Forschungsinstitut Borstel, nicht möglich gewesen. Bei ihm und bei seinen Mitarbeitern, in erster Linie Hermann Moll und Ursula Schombel, sowie dem damaligen Leiter seiner Abteilung, Herrn Prof. Ernst Th. Rietschel, möchte ich mich deshalb ganz herzlich bedanken.

Prof. Thomas Hartung, Prof. Corinna Hermann sowie Dr. Siegfried Morath und Dr. Sonja von Aulock, Universität Konstanz, danke ich für ihre langjährige Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch Prof. Jörg R. Weber, Universität Klagenfurt, sowie Dr. Holger Heine und Dr. Christian Alexander, Forschungszentrum Borstel, für zahlreiche Hilfestellungen, interessante Kooperationen und anregende Diskussionen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Frank L. Heppner für seine Unterstützung.

Schließlich danke ich meiner Frau Daniela Meister und meiner Tochter, Pauline Mathilda Meister, für Alles.

## Eidesstattliche 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,
- 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