

**Aus dem Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen
Sektion Humanparasitologie
Leiter: Prof. Dr. P. G. Kremsner**

**Rekonstruktion und Funktionsanalyse
einer Mutation des *Toll-like*-Rezeptors 2 in vitro**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Jutta Wolff, geb. Weinkötz,
aus Flensburg**

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h. c. N. Blin

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Kun

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Die erworbene Immunität.....	1
1.1.2 Die angeborene Immunität.....	1
1.1.2.1 Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs).....	2
1.1.2.2 Mustererkennende Rezeptoren (PRRs).....	3
1.2 Toll-like-Rezeptoren (TLRs)	3
1.2.1 TLR-Signaltransduktion.....	5
1.3 Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2)	8
1.4 Polymorphismen von <i>Toll-like-Rezeptoren</i>	9
1.5 Fragestellung	10
2 MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 Verwendete Puffer und Medien	11
2.1.1 Bakterienmedium (LB-Medium).....	11
2.1.2 Agarplatten.....	11
2.1.3 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (10xPBS).....	12
2.1.4 Tris-Borat-EDTA-Puffer (10xTBE-Puffer).....	12
2.1.5 Probenpuffer für Agarosegele.....	12
2.1.6 Phosphat-Puffer (2xHBS).....	13
2.1.7 SOB-Medium.....	13
2.2 Verwendete Plasmide	14
2.2.1 pcDNA3.....	15
2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	16
2.4 Oligonukleotide	17

2.5 Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese	18
2.6 Verfahren zur Reinigung von DNS	19
2.6.1 E.Z.N.A. [®] Cycle-Pure Kit.....	19
2.6.2 NucleoSpin [®] Extract Kit.....	20
2.7 Transformation in <i>E. coli</i>	21
2.8 Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNS aus Bakterien	22
2.8.1 Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNS	22
2.8.2 Isolierung großer Mengen Plasmid-DNS	22
2.8.3 Konzentrationsbestimmung von DNS-Lösungen	23
2.9 Einfügen einer Punktmutation in ein Plasmid	24
2.10 Sequenzierung von DNS.....	26
2.10.1 Sequenzierungsreaktion	26
2.10.2 Aufreinigung der Produkte der Sequenzierungsreaktion.....	27
2.10.3 Sequenziererelektrophorese	27
2.11 Restriktion von DNS.....	27
2.11.1 Restriktion eines Vektors	28
2.11.2 Restriktion von DNS-Fragmenten	28
2.12 Ligation von DNS-Fragmenten in Plasmide (Klonierung).....	28
2.13 HEK293-Zellkultur	29
2.13.1 Auftauen der Zellen.....	29
2.13.2 Aussäen der Zellen.....	30
2.13.3 Konzentrationsbestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension	30
2.14 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen	30
2.14.1 Kalziumphosphatpräzipitation	31
2.14.2 Kontrolle der Transfektion.....	32
2.14.3 Stimulation der HEK293-Zellen.....	32

2.15 Luziferase Reporter Assay System	34
2.16 Verwendete Proben	35
2.17 Statistische Analyse	35
3 ERGEBNISSE.....	36
3.1 Sequenzierung des zweiten Exons des <i>TLR2</i>.....	36
3.2 Klonierung der TLR2-Konstrukte H571 und R571	43
3.3 Die Induktion von NF-κB durch bakterielles Lipoprotein in HEK293- Zellen.....	45
3.3.1 Ergebnisse der Zellkultur	46
3.3.2 Deskriptive Statistik.....	49
4 DISKUSSION	50
4.1 TLR-Mutationen im Mausmodell	50
4.2 Funktionelle Relevanz von TLR2-Polymorphismen	51
5 ZUSAMMENFASSUNG	55
6 ROHDATEN	56
7 LITERATURVERZEICHNIS	57
8 DANKSAGUNG	62
9 LEBENS LAUF	63

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abbildung 1: Schemazeichnung TLR	4
Abbildung 2: Zellaktivierung durch pathogen-assoziierte molekulare Muster mittels TLR2	7
Abbildung 3: Plasmid pcDNA3 (Invitrogen)	15
Abbildung 4: Prinzip des QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit	25
Abbildung 5: Prinzip der Kalziumphosphattransfektion und Stimulation des TLR2 mit BLP unter Anwendung des Luziferase Reporter Assay in HEK293-Zellen	33
Abbildung 6: Zweites Exon des TLR2	37
Abbildung 7: Mutationen im zweiten Exon des TLR2	42
Abbildung 8a: Agarosegelelektrophoresebild der Restriktion von H571 mit BamH1 und Xho1	44
Abbildung 8b: Agarosegelelektrophoresebild der Restriktion von R571 mit BamH1 und Xho1	44
Abbildung 9: NF-κB-Aktivität in stimulierten und unstimulierten Kontrollproben	47
Abbildung 10: NF-κB-Aktivität in stimulierten und unstimulierten H571- und R571-Zellkulturproben	48

VERZEICHNIS DER TABELLEN

<i>Tabelle 1: Zur Transfektion verwendete Plasmide</i>	<i>14</i>
<i>Tabelle 2: Klonierungs-PCR</i>	<i>17</i>
<i>Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide.....</i>	<i>18</i>
<i>Tabelle 4: Mutagenese-PCR</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 5: Sequenzierungsreaktion</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 6: Charakteristik der 6 Polymorphismen</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 7: Deskriptive Statistik.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 8: Rohdaten der Luziferase-Assays</i>	<i>56</i>

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Aqua dest.	destilliertes Wasser
BamH1	Restriktionsendonuklease aus <i>Bacillus amyloli</i>
BLP	bakterielles Lipoprotein
Bp	Basenpaare
CD	„cluster of differentiation“, Differenzierungsfaktor
DNA/DNS	„desoxyribonucleid acid“/Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	„fetal calf serum“, fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFP	grünfluoreszierendes Protein
H571	TLR2-Wildtypkonstrukt
H571R	TLR2-Polymorphismus
HLA	humane Leukozytenantigene
HEK	„human embryonal kidney cells“
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HBS	„hepes buffer saline“, Phosphatpuffer
HSP60	Hitzeschockprotein 60

IKK complex	„inhibitor of nuclear factor- κ B(I κ B)-kinase complex“
IL	Interleukin
INF	Interferon
IRAK	„IL-1-receptor-associated kinase“
IRF3	„interferon-regulatory factor 3“
LB	<i>Luria Broth</i> , Bakterienmedium
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LDH	Laktatdehydrogenase
LE	Lichteinheiten
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	„leucin-rich-repeats“, leuzinreiche Domäne
LTA	„lipoteichoic acid“, Lipoteichonsäure
m	„murine“, Maus
M	Mol
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
MHC	„major histocompatibility complex“, Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mM	Millimol
MyD88	„myeloid differentiation protein 88“
NF- κ B	nukleärer Faktor- κ B
ng	Nanogramm
NIK	„NF- κ B-inducing kinase“
nm	Nanometer
NO	„nitric oxide“, Stickstoffmonoxid
NTP	Nukleotidtriphosphat

Pam ₃ -Cys	N-acetyl-S-diacylglyceryl-cystein-Säure
PAMP	„pathogen-associated molecular pattern“, Pathogen-assoziertes molekulares Muster
PBS	„phosphate-buffered saline“, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
PG	Peptidoglykan
PI3-K	„phosphatidylinositid-3 kinase“
PKB	„protein kinase B“
pmol	Picomol
PRR	„pattern-recognition receptor“, mustererkennender Rezeptor
R571	TLR2-Mutantenkonstrukt
rLA	relative Luziferaseaktivität
RNS	Ribonukleinsäure
SOB	Zellkulturmedium
TAB	„TAK-1-binding protein“
TAK1	„transforming-growth-factor-β-activated kinase 1“
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF	„transforming growth factor“, transformierender Wachstumsfaktor
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF	„TNF-receptor-associated factor“
TRIF	„TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN-β“
TIRAP	„TIR-domain-containing adaptor protein“

U	„units“, Einheiten
UBC 13	„ubiquitin-conjugating enzym 13“
UEV1A	„ubiquitin-conjugating enzym E2 variant 1“
Xho1	Restriktionsendonuklease aus <i>Xanthomonas holcicola</i>

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, den Körper vor Infektionen durch Pathogene (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten) zu schützen. Um dieser Aufgabe gerecht zu werden, muss das Immunsystem das eingedrungene Pathogen erkennen, von körpereigenem Gewebe unterscheiden und bekämpfen können. Bei höheren Vertebraten wird dabei zwischen angeborener Immunität („innate immunity“) und erworbener Immunität („adaptive immunity“) unterschieden.

1.1.1 Die erworbene Immunität

Das adaptive Immunsystem erkennt Pathogene durch Antigenrezeptoren auf der Oberfläche von T- und B-Lymphozyten. Jede ungeprägte T- oder B-Zelle trägt nur Rezeptoren mit einer Spezifität auf der Oberfläche. Die Rezeptorspezifität wird durch genetische Rekombination während der Entwicklung der Zellen im Knochenmark und Thymus festgelegt, wodurch ein sehr großes Repertoire an Antigenrezeptoren entsteht (16). Auf diesen Prozess folgt die somatische Selektion der Antigenrezeptoren, die die Auswahl der relevanten Effektorzellen sowie die Elimination autoreaktiver Lymphozyten beinhaltet.

Wenn ein rezirkulierender Lymphozyt sein spezifisches Antigen im peripheren Lymphgewebe erkennt, kommt es zur klonalen Selektion und zur Proliferation dieses Lymphozyten in eine Effektorzelle. Ein Teil der proliferierenden Lymphozyten entwickelt sich zu Gedächtniszellen, die im Körper zirkulieren und somit bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Pathogen eine schnelle Immunabwehr auslösen können.

1.1.2 Die angeborene Immunität

Die schnelle Erkennung und Reaktion auf in den Organismus eingedrungene Pathogene und die Modulation der erworbenen Immunabwehr sind die Hauptaufgaben des angeborenen Immunsystems (17).

Eingedrungene Krankheitserreger werden durch Rezeptoren von Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. Makrophagen, neutrophile Granulozyten) erkannt. Diese Rezeptoren, sogenannte mustererkennende Rezeptoren („pattern-recognition receptors“, PRRs, s. 1.1.2.2), erkennen bestimmte in der Evolution hoch konservierte Strukturen, die als Pathogen-assoziierte molekulare Muster („pathogen-associated molecular patterns“, PAMPs, s. 1.1.2.1) bezeichnet werden (29). Des Weiteren ist die Detektion von Krankheitserregern auch durch lösliche Faktoren wie z.B. das Komplementsystem und Lektine sowie durch antimikrobielle Peptide möglich. Durch die Sekretion von inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen, durch Antigenpräsentation humaner Leukozytenantigene (HLA) sowie durch die Expression kostimulierender Moleküle wird der weitere Verlauf der Immunreaktion gesteuert. Es kommt zur klonalen Proliferation der diesen Antigen erkennenden naiven CD4-T-Lymphozyten, die ihrerseits wiederum für die Aktivierung von B-Lymphozyten, CD8-T-Lymphozyten und weiteren Makrophagen benötigt werden (17).

1.1.2.1 Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs)

Pathogen-assoziierte molekulare Muster sind Strukturen, die in einer Vielzahl von Mikroorganismen vorkommen. Beispiele für Pathogen-assoziierte molekulare Muster sind bakterielle Lipoproteine (BLPs), Lipopolysaccharide (LPSs), Peptidoglykane (PGs), Mannane, Lipoteichonsäuren (LTAs), Glykane, doppelsträngige RNS und bakterielle DNS. PAMPs werden nur von Mikroorganismen produziert und sind essentiell für deren Überleben. Da sie innerhalb einer Klasse von Mikroorganismen gleich sind, kann eine große Anzahl von Mikroorganismen durch eine verhältnismäßig geringe Anzahl von mustererkennenden Rezeptoren erkannt werden (27).

Bakterielle Lipoproteine werden von allen Bakterien exprimiert. Durch deren charakteristische N-terminale Lipoaminosäure, N-acetyl-S-diacylglyceryl-cystein, wird z.B. Toll-like-Rezeptor 2 aktiviert (3).

1.1.2.2 Mustererkennende Rezeptoren (PRRs)

Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems können funktionell in drei Klassen von mustererkennenden Rezeptoren eingeteilt werden, die nicht nur auf der Zelloberfläche, sondern auch intrazellulär vorkommen (28). Endozytotisch agierende Rezeptoren kommen auf der Oberfläche von Phagozyten vor und stimulieren die Ingestion erkannter Mikroorganismen. Sezernierte Rezeptoren binden an mikrobielle Zellwände, markieren diese zur weiteren Erkennung durch das Komplementsystem und Phagozyten und wirken somit als Opsonine.

Die dritte Gruppe der mustererkennenden Rezeptoren sind auf der Zelloberfläche lokalisiert. Sie besitzen die Fähigkeit, Informationen über die erkannten pathogenen Strukturen mit Hilfe von Signaltransduktionskaskaden in die Zelle zu übermitteln, um auf diese Weise die Expression verschiedener Gene zu induzieren. Toll-like-Rezeptoren sind dieser letzten Gruppe zuzuordnen.

1.2 Toll-like-Rezeptoren (TLRs)

Der Zusammenhang zwischen Toll-Rezeptoren und dem angeborenen Immunsystem wurde zuerst in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Toll wurde als transmembranärer Rezeptor identifiziert, dessen Gen bei der Fruchtfliege entscheidend für die dorsoventrale Polarisierung der Ontogenese ist (4;15).

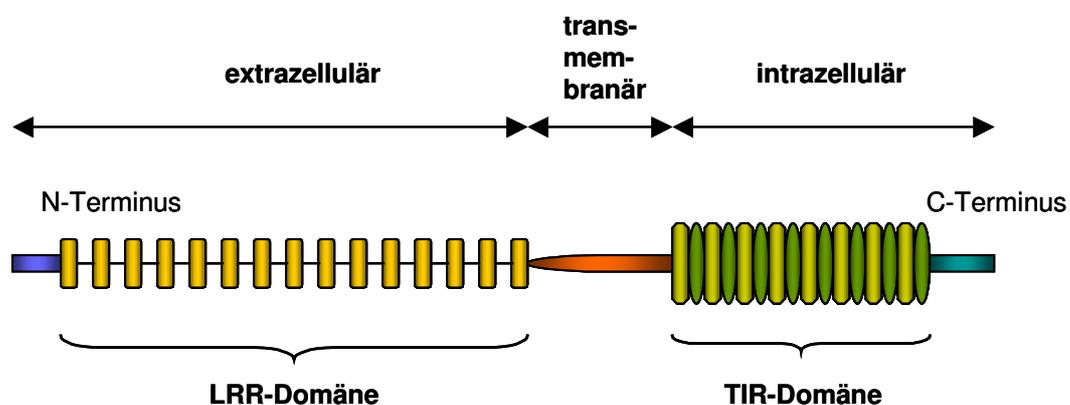
Die zytoplasmatische Domäne des *Drosophila*-Toll-Rezeptors, Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne (TIR), zeigt Sequenzhomologien zum humanen Interleukin-1-Rezeptor. Durch Aktivierung des jeweiligen Toll-Rezeptors werden Signaltransduktionswege induziert, die unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors nukleärer Faktor- κ B (NF- κ B) führen (6). Basierend auf dieser Ähnlichkeit wurde angenommen, dass der Toll-Signalweg eine Rolle in der angeborenen Immunität spielt. Diese Annahme konnte Lemaitre bestätigen, indem er zeigte, dass antifungale und antimikrobielle Proteine nach der

Aktivierung von Mitgliedern der *Drosophila*-Toll-Rezeptorfamilie induziert werden (23).

Medzhitov et al. entdeckten 1997 das erste humane Toll-Homolog, welches später als Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) bezeichnet wurde (30). Bis heute sind 11 Toll-like-Rezeptoren und drei Homologe dieser Familie auf den Chromosomen 1, 3, 4 und 9 lokalisiert worden.

Toll-like-Rezeptoren werden auf der Oberfläche immunkompetenter Zellen exprimiert (33), dabei können unterschiedliche Toll-like-Rezeptoren auch gemeinsam exprimiert werden. Toll-like-Rezeptoren sind Typ-1-Transmembranrezeptoren (s. Abb. 1), deren extrazelluläre N-terminale Domäne als leuzinreiche Domäne („leucin-rich-repeats“, LRR) charakterisiert wurde. An diese schließt sich ein zysteinereiches Areal („leucin rich repeat C-terminal domain“, LRRCT) an, auf das eine strukturell noch undefinierte transmembranäre Domäne folgt (34). Der zytoplasmatische Anteil wurde als Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne charakterisiert (TIR-Domäne) (30).

Abbildung 1: Schemazeichnung TLR



Von den Rezeptoren werden unterschiedliche Liganden erkannt, durch die der jeweilige Rezeptor aktiviert und eine Signalkaskade ausgelöst wird. Die Aktivierung der TLRs stimuliert u.a. Makrophagen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und antimikrobieller Moleküle und initiiert die Reifung von dendritischen Zellen (17).

Die physiologische Funktion der einzelnen Rezeptoren wurde hauptsächlich in

Tierversuchen mit Mäusen analysiert. TLR4 wird vor allem durch Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien aktiviert. TLR5 hingegen erkennt bakterielles Flagellin. Als intrazellulär lokalisierter Rezeptor erkennt TLR9 nicht-methylierte bakterielle DNS. Die Funktion von TLR3 liegt in der Erkennung von doppelsträngiger RNS. Um mit einem größeren Spektrum von Liganden interagieren zu können, formt TLR2 Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 (36). Diese Heterodimere binden mikrobielle Lipoproteine und Glykolipide und eine Reihe anderer Bestandteile von Mikroorganismen. Durch diese Interaktionen der Rezeptoren wird eine verbesserte und vielfältigere Erkennung von Pathogenen erreicht (41).

1.2.1 TLR-Signaltransduktion

Die Signaltransduktion der Toll-like-Rezeptoren, die nach deren Aktivierung durch einen Liganden ausgelöst wird, basiert auf einer Kaskade intrazellulärer und biochemischer Abläufe. Durch Proteininteraktionen, Konformationsänderungen und Phosphorylierungen wird eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren bewirkt, die ihrerseits die Transkription der für die Immunantwort notwendigen Gene initiieren (s. Abb.2).

Die Toll-like-Rezeptoren aktivieren unterschiedliche Signalwege, deren Ausgangspunkt die TIR-Domäne des Rezeptors darstellt. Diese wiederum interagiert mit TIR-Domänen von verschiedenen Adaptermolekülen und führt somit zu deren Aktivierung.

Bei dem als erstes charakterisierten Signalweg wird das Adapterprotein MyD88 („myeloid differentiation protein 88“) durch die Aggregation der TIR-Domäne des TLR an die TIR-Domäne des Adapterproteins aktiviert. Dieser wird daher als MyD88-abhängiger Signalweg bezeichnet (42). Der MyD88-abhängige Signalweg kann von allen TLRs aktiviert werden und ist essentiell für die Produktion inflammatorischer Zytokine.

MyD88 besteht aus einer TIR-Domäne und einer Todesdomäne („death-domain“). Nach der Aktivierung des Adapterproteins wird dieses über Todesdomän-Todesdomän-Interaktionen die Aktivierung der Interleukin-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAK) 1 und 4 vermittelt, die ihrerseits die

Phosphorylierung von TNF-Rezeptor-assoziiertem Faktor 6 (TRAF6) bewirken. Nach der Phosphorylierung von TRAF6 kommt es zur Komplexbildung mit dem Ubiquitin-konjugierendem Enzym 13 (UBC13), dem Ubiquitin-konjugierendem Enzym E2 Variante 1 (UEV1A), der TGF- β -aktivierenden Kinase 1 (TAK1) und den TAK1-bindenden Proteinen (TAB) 1 und 2. Dieser Komplex induziert die Phosphorylierung des I κ B-Kinase-Komplexes („inhibitor of nuclear factor- κ B(I κ B)-kinase complex“), bestehend aus den Kinasen IKK α , IKK β und IKK γ (1). Die Phosphorylierung von IKK, das im Zytoplasma gebunden an NF- κ B vorliegt, bewirkt den proteasomalen Abbau von I κ B. Freies NF- κ B kann in den Zellkern wandern und führt dort zur Aktivierung von NF- κ B-abhängigen Genen, z.B. der Gene für Interleukin-1 und Interleukin-6.

Kawai et al. konnten nachweisen, dass bei MyD88-Knockout-Mäusen trotz Stimulation mit Endotoxinen keine Aktivierung von NF- κ B durch TLR2, TLR7 oder TLR9 stattfand (21). Dennoch konnte eine TLR4-induzierte NF- κ B-Aktivierung festgestellt werden, was auf das Vorhandensein eines MyD88-unabhängigen Signalweges schließen lässt. TLR4 ist demnach in der Lage, Transkriptionsfaktoren über ein weiteres Adapterprotein, genannt TRIF („TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN- β “), zu aktivieren. Dieser Signalweg, auch als MyD88-unabhängiger Signalweg bezeichnet, kann des Weiteren von TLR3 induziert werden und führt zur Induktion von Interferon- β (50).

Ein weiteres TIR-Domänen enthaltendes Molekül wurde als TIR-Domänen-enthaltendes Adapterprotein (TIRAP) identifiziert. Bei TIRAP-Knockout-Mäusen konnte auf die Stimulation des TLR2 oder TLR4 mit den jeweiligen Liganden keine Zytokinproduktion als positive Stimulationsantwort nachgewiesen werden. TLR3, TLR7 und TLR9 zeigten jeweils eine normale Reaktion auf die Stimulation. Bei Versuchen mit MyD88/TIRAP-Knockout-Mäusen konnte jedoch eine TLR4-induzierte Aktivierung von Interferon festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass TIRAP notwendig für den MyD88-abhängigen Signalweg von TLR2 und TLR4 ist (49).

Die Aktivierung von TLR2 kann darüber hinaus über einen weiteren noch nicht genauer erforschten Signalweg mittels PI3-K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und PKB (Proteinkinase B) ebenfalls zur Aktivierung von NF- κ B führen (5;13).

1.3 Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2)

Das *TLR2*-Gen ist auf der chromosomalen Region 4q32 lokalisiert. Die dort kodierte DNS-Sequenz besteht aus 2352 Basenpaaren, also aus insgesamt 784 Aminosäuren. Die extrazelluläre Domäne (LRR-Domäne) des Transmembranrezeptors wird von den Aminosäuren 1 bis 588, die transmembranäre Domäne von den Aminosäuren 589 bis 609 und die zytoplasmatische Domäne (TIR-Domäne) von den Aminosäuren 610 bis 784 gebildet. *TLR2* besteht aus zwei Exons, wobei das zweite Exon den gesamten codierenden Bereich umfasst (14).

Auf Zellen des hämatopoetischen Systems (z.B. Monozyten, Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen) sowie auf T- und B-Lymphozyten werden Toll-like-Rezeptoren 2 am stärksten exprimiert. Die extrazelluläre Domäne des Rezeptors spielt eine entscheidende Rolle in der Spezifität der Ligandenerkennung und der Dimerisation mit TLR1 und TLR6. TLR2 ist für die Erkennung mikrobieller Antigene (z.B. Lipopeptide, PAMPs, Lipopolysaccharide) verantwortlich (22). Durch die Bindung eines Liganden an den Rezeptor kommt es zur Zellaktivierung, Zytokinausschüttung und in Abhängigkeit von den Liganden auch zur Apoptose (3;22). Die durch die TLR2-Aktivierung ausgelöste Genexpression ist abhängig von dem Liganden und dem durch diesen aktivierten Signalweg (18).

Bereits 1999 gelang der Nachweis, dass grampositive Bakterien über TLR2 das Immunsystem aktivieren (51). Diese Tatsache ist von besonderer klinischer Relevanz, da grampositive Bakterien eine Hauptursache für schwere Infektionen mit Organversagen oder septischem Schock darstellen.

Van Der et al. konnten z.B. zeigen, dass schistosomale Phosphatidylserine TLR2 aktivieren, und dass diese Aktivierung notwendig für die Induktion von Interleukin-10-produzierenden regulatorischen T-Lymphozyten ist (47).

Wie unterschiedlich die Auswirkungen einer Aktivierung des Rezeptors ausfallen, konnten Aliprantis et al. darstellen, indem sie im Zellversuch nachwiesen, dass die Aktivierung von TLR2 durch bakterielle Lipoproteine sowohl Apoptose als auch NF- κ B-Aktivierung bewirken kann (2).

Des Weiteren ist TLR2 für die Erkennung von endogenen Substanzen

verantwortlich, die von nekrotischen oder apoptotischen Zellen ausgeschüttet werden (11). Dem Rezeptor wird somit auch eine anti-apoptotische Funktion zugeschrieben. Ohashi et al. und Vabulas et al. postulierten das Hitzeschockprotein 60 (HSP60) als potenten Stimulus für eine TLR2-Aktivierung und somit eine Zytokinausschüttung (44;45).

Die Größe und Vielfalt des durch TLR2 detektierbaren Ligandenspektrums liegt zum einen darin begründet, dass TLR2 in der Lage ist sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 zu formen (36). Durch diese Interaktion der Rezeptoren wird eine verbesserte und vielfältigere Erkennung von Pathogenen erreicht (40).

TLR2 nimmt aufgrund seiner großen Variabilität der Reaktionsmuster auf eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden einen besonderen Stellenwert innerhalb der Gruppe der TLRs ein.

1.4 Polymorphismen von *Toll-like-Rezeptoren*

Polymorphismen sind Varianten unterschiedlicher Gensequenzen in einer Bevölkerung mit einer Frequenz größer als 1%, die z.B. durch Deletion einzelner Basenpaare der DNS entstehen können.

Toll-like-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort eines Organismus auf ein eingedrungenes Pathogen. Treten Polymorphismen auf, kann die „normale“ Immunreaktion des Organismus auf ein eingedrungenes Pathogen verändert sein. Die Auswirkung eines Polymorphismus ist abhängig davon, ob die Aminosäuresequenz durch diesen verändert worden ist. Treten lediglich einzelne Nukleotidpolymorphismen ohne Änderung der Aminosäuresequenz auf, werden diese als synonyme Polymorphismen bezeichnet. Wird die Aminosäuresequenz verändert spricht man von nicht-synonymen Polymorphismen, deren funktionelle Relevanz im Einzelfall zu klären ist.

Kang et al. konnten bereits zeigen, dass Patienten, die eine Mutation des *TLR2*-Gens aufweisen, signifikant niedrigere Interleukin-2-Serumspiegel aufweisen als solche, die keine Aminosäureveränderungen im *TLR2*-Gen besitzen (20).

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Gensequenz für den kodierenden Bereich des *TLR2* analysiert. Die Proben sind im Rahmen einer klinischen Studie, die sich mit der Erkrankung der Schistosomiasis befasst hat, Patienten in Gabun (Westafrika) entnommen worden. Die Gensequenz wurde auf mögliche Polymorphismen untersucht. Dabei wurden sechs Polymorphismen gefunden, von denen ein Polymorphismus in der Literatur noch nicht beschrieben worden ist.

Die Isolierung der Gensequenz dieses Polymorphismus, dessen Rekonstruktion und Einbringung in ein Plasmid sowie die anschließenden Zellkulturversuche dienten als Ansatz, um der Frage nach der Funktionalität dieser Mutation im *TLR2* und deren Auswirkungen auf das Immunsystem nachzugehen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Puffer und Medien

2.1.1 Bakterienmedium (LB-Medium)

Ansatz für einen Liter:

Bactotryptone	10 g
Bacto-Yeast-Extrakt	5 g
NaCl	10 g

Nach dem Abwiegen der Chemikalien werden diese in einem Erlenmeyerkolben in einem Liter Aqua dest. mit einem Magnetrührer aufgelöst. Der pH-Wert der Lösung wird auf 7,0 eingestellt und dann autoklaviert. Nachdem die Lösung abgekühlt ist, kann man zur weiteren Verwendung Antibiotika zusetzen. In dieser Arbeit wurde stets Ampicillin verwendet.

2.1.2 Agarplatten

Für die Herstellung von Agarplatten wird dem, wie in 2.1.1 beschrieben, angefertigtem LB-Medium 15 g/l Agar zugefügt. Nachdem die Lösung autoklaviert und auf Handwärme abgekühlt ist, wird das gewünschte Antibiotikum (z.B. 50 µg/ml Ampicillin) zugegeben und anschließend je 30 ml in die Petri-Schalen (ca. 10 cm Durchmesser) gegossen. Die Platten werden sofort mit dem Deckel verschlossen, nach ca. eine Stunde Verfestigungszeit bei Raumtemperatur umgedreht und im Wärmeschrank bei 37°C über Nacht getrocknet. Die Aufbewahrung der fertigen Agarplatten erfolgt im Kühlschrank.

2.1.3 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (10xPBS)

Ansatz für einen Liter:

NaCl (1,37 M)	80 g
KCl (27 mM)	2 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (43 mM)	7,65 g
KH ₂ PO ₄ (14 mM)	2 g

Das Gemisch wird in 800 ml Aqua dest. aufgelöst. Der pH wird auf einen Wert von 7,3 bis 7,4 eingestellt und anschließend mit Aqua dest. auf ein Volumen von einem Liter aufgefüllt und autoklaviert.

2.1.4 Tris-Borat-EDTA-Puffer (10xTBE-Puffer)

Ansatz für einen Liter:

Tris (0,9 M)	108 g
Borsäure (0,9 M)	55,8 g
EDTA (20 mM)	7,44 g

Die Chemikalien werden in einem Liter Aqua dest. vollständig gelöst und vor Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

2.1.5 Probenpuffer für Agarosegele

Zusammensetzung des Probenpuffers:

Xylencyanol	0,1%
Bromphenolblau	0,1%
Glycerin	40%
EDTA	10 mM

2.1.6 Phosphat-Puffer (2xHBS)

Für die Herstellung des 2xHBS-Phosphat-Puffers werden folgende Chemikalien verwendet:

NaCl	8,18 g
HEPES	5,94 g
Na ₂ HPO ₄	0,2 g

Die Chemikalien werden in 450 ml Aqua dest. Gelöst. Die Lösung wird auf einen pH-Wert von 7,12 eingestellt. Anschließend wird die Lösung auf ein Gesamtvolumen von 500 ml mit Aqua dest. aufgefüllt, unter der Sterilbank filtriert und in Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots werden bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.1.7 SOB-Medium

Ansatz für einen Liter:

Bacto-Tryptone	20 g
Bacto-Yeast-Extrakt	5 g
NaCl	0,5 g
KCl (1 M)	2,5 ml

Die Chemikalien werden in 900 ml Aqua dest. gelöst und auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Das Volumen wird mit Aqua dest. auf 990 ml aufgefüllt. Die Lösung wird autoklaviert und vor Gebrauch wird 10 ml steriles MgCl₂ (1 M) zugefügt.

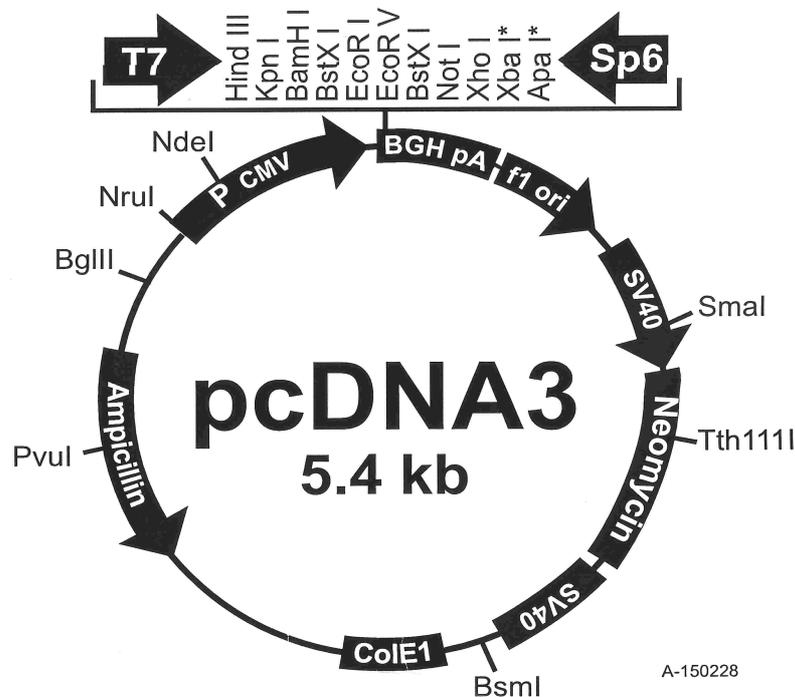
2.2 Verwendete Plasmide

Tabelle 1: Zur Transfektion verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Herkunft
pEGFP-C1	Plasmid kodiert GFP mit CMV IE Promoter	Clontech Laboratories, California, USA
pRL-TK	Enthält Renilla-Luziferase-Gen und einen HSV-TK Promotor	Promega, Madison, USA
6NF- κ Btkluc.neo	Enthält NF- κ B-Bindungsstelle, Firefly-Luziferase-Gen und einen Thymidin-Kinase-Promotor	Martin Bergmann et. al., Department of Thoracic Medicine, England
pcDNA3	Enthält CMV-, T-7-, Sp6-, SV40-Promotor (s. 2.2.1)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NIK	pcDNA3 mit NF- κ B-induzierendem Kinase-Gen	Benjamin Mordmüller, Tropeninstitut Tübingen
SPHA	pcDNA3 mit TLR2 ohne eigenes Signalpeptid, dafür mit dem Signalpeptid von pdGF-Rezeptor (Invitrogen)	Benjamin Mordmüller, Tropeninstitut Tübingen
TLR2-Wildtyp (H571)	SPHA mit 2. Exon des TLR2	Jutta Wolff, diese Arbeit
TLR2-Mutante (R571)	SPHA mit 2. Exon des TLR2 mit dem Polymorphismus Histidin (H) zu Arginin (R) an der Position 571	Jutta Wolff, diese Arbeit

2.2.1 pcDNA3

Abbildung 3: Plasmid pcDNA3 (Invitrogen)



Der Vektor SPHA (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Benjamin Mordmüller, Institut für Tropenmedizin Tübingen) wird als Ausgangsvektor für die Klonierungen verwendet. Als Grundlage dient der pcDNA3-Vektor (s. Abb. 3), in dessen BamH1-Schnittstelle das zweite Exon des *TLR2* eingefügt wird (s. 2.11). Das Signalpeptid des *TLR2* wird durch das Signalpeptid des pdBF-Rezeptors (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ersetzt. Dieses Signalpeptid ist für den Transport des Rezeptors an die Oberfläche der Zelle verantwortlich. Zur Klonierung des Wildtyps wird der kodierende Bereich des zweiten Exons des *TLR2* zwischen die Schnittstellen der Enzyme BamH1 und Xho1 eingefügt. Die Mutation wird durch einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin an Position 20331 des *TLR2* im Wildtyp-Plasmid konstruiert (s. 2.9).

2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein In-vitro-Verfahren zur Amplifikation von DNS-Fragmenten definierter Länge und Sequenz.

Eine PCR-Reaktion läuft in Zyklen mit drei sequentiellen Phasen ab:

1. die Denaturierung der Doppelstrang-DNS
2. die Hybridisierung der Starteroligonukleotide („Annealing“)
3. die Reduplikation der Einzelstränge durch eine temperaturstabile DNS-Polymerase (Extension)

Die Länge der neu gebildeten Doppelstränge entspricht dem Abstand zwischen den beiden Primern, und somit dem gewünschten DNS-Fragment. Durch die PCR wird eine exponentielle Vervielfältigung der für die Primer spezifischen Region erreicht.

Alle PCR-Programme werden mit dem Hybaid Omn-E (ThermoLife Science) ausgeführt. Die Reaktion wird mit einer zwei Minuten langen Phase bei 94 °C begonnen, um die vollständige Denaturierung der Matrizen-DNS zu gewährleisten. Ein Amplifikationszyklus umfasst die Denaturierung mit einer Dauer von einer Minute bei 94 °C, den Hybridisierungsschritt mit einer Dauer von einer Minute bei 50 °C sowie der Polymerisation über drei Minuten bei einer Temperatur von 72 °C. Dieser Zyklus wird insgesamt 38 Mal wiederholt. Nach Beendigung der 38 Zyklen schließt sich eine einmalige Extensionsphase von 10 Minuten an (s.Tab. 2).

Der Reaktionsansatz für die Klonierungs-PCR wird in Eppendorfgefäßen (500 µl) auf Eis pipettiert.

Reaktionsansatz :

Aqua dest.	33,8 µl
Reaktionspuffer (10-fach, QIAGEN, Hilden, Deutschland)	5 µl
MgCl ₂ (QIAGEN, Hilden, Deutschland)	3 µl
dNTPs (40 mM)	0,5 µl
Taq-Polymerase (1 U/µl)	0,2 µl
Bam-Tlr2-F (vorwärts)	3 µl
Xho-Tlr2-R (rückwärts)	3 µl
Template DNS	1,5 µl

Tabelle 2: Klonierungs-PCR

Phase	Vorgang	Temperatur (°C)	Dauer	
1.	Primärdenaturierung	94	2 Minuten	
2.	Denaturierung	94	1 Minute	38 Zyklen
	Hybridisierung	50	1 Minute	
	Polymerisation	72	3 Minuten	
3.	Extension	72	10 Minuten	

Die Amplifikation der gewünschten DNS-Sequenz wird mit einer Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide werden mit Aqua dest. auf eine Konzentration von 1 µl/100 µM eingestellt und vor Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

Die in Tabelle 3 aufgelisteten Oligonukleotide werden alle von QIAGEN Operon GmbH (Köln, Deutschland) bezogen.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

Die Tabelle zeigt die verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Primer als Triplets der Basen A=Adenin, C=Cytosin, G=Guanin und T=Thymin (Bp=Basenpaare).

Primer	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Länge (in Bp)
1.) Primer für die Sequenzierungsreaktion		
Juta-1	CAC TCA GGA GCA GCA AGG ACT	21-mer
Juta-2	CAT ATA CCG CAG GCC ATG GAA A	22-mer
2.) Primer zur Herstellung der Fragmente für die Ligation		
Bam-Tlr2-F	TTT GGA TCC CTC TCC AAG GAA GAA TCC TCC	30-mer
Xho-Tlr2-R	TTT CTC GAG CTA GGA CTT TAT CGC AGC	27-mer
3.) Primer für Mutagenese-PCR		
JuttMutF	GAC TCT CCA TCC CAT GTG CAT GGC CAG CAG GGT CA	35-mer
JuttMutR	TGA ACC TGC TGG CCA TGC ACA TGG GAT GGA GAG TC	35-mer

2.5 Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der DNS wird durch ihre negative Ladung ermöglicht, so dass DNS-Fragmente entsprechend ihrer Größe mit jeweils unterschiedlicher Laufgeschwindigkeit in Richtung Anode wandern. Kleine DNS-Fragmente wandern dabei schneller als große DNS-Fragmente.

Abhängig von der Größe der zu trennenden DNS-Fragmente werden 1 bis 2%-ige Agarosegele verwendet. Hierzu wird 1 bzw. 2 g Agarose in 100 ml 1xTBE-Puffer (s. 2.1.4) aufgekocht, abgekühlt und dann mit Ethidiumbromid in einer Konzentration von 10 mg/ml versetzt, um eine visuelle Darstellung zu ermöglichen. Danach wird das Gel in einen Träger gegossen und mit einem

Probenkamm versehen, damit nach Abkühlung und Verfestigung des Gels Geltaschen zum Auftragen der DNS-Proben erhalten bleiben. Das feste Gel wird, nach der Entfernung des Probenkammes, in eine mit 10xTBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt.

Nachdem die zu analysierenden Proben mit einem Probenpuffer (s. 2.1.5) vermischt worden sind, werden sie in die Geltaschen pipettiert. Gleichzeitig wird auch ein DNS-Größenmarker zur Größenbestimmung (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) aufgetragen. Je nach Größe und Konzentration der DNS-Proben wird dann eine Spannung von 80 bis 200 Volt an die Elektrophoresekammer angelegt. Nach 20 bis 60 Minuten kann man die DNS-Banden unter UV-Licht betrachten, deren Größe abschätzen und fotografisch dokumentieren.

2.6 Verfahren zur Reinigung von DNS

2.6.1 E.Z.N.A.[®] Cycle-Pure Kit

Das E.Z.N.A.[®] Cycle-Pure Kit (PeqLab Biotechnology, Erlangen, Deutschland) wird verwendet, um DNS-Amplifikate aus PCR-Reaktionsansätzen aufzureinigen.

Das folgende Protokoll wird mit einer Biofuge pico Zentrifuge (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) und 10000 x *g* bei allen Zentrifugationsschritten durchgeführt.

Der PCR-Ansatz wird durch Vortexen mit 4 bis 5 Teilen CP-Puffer gemischt und auf eine HiBind[®]-Zentrifugensäule, die zuvor in ein Sammelröhrchen (2 ml) gestellt wird, pipettiert. Die Säule wird für eine Minute zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wird verworfen. Zum Waschen der DNS werden 750 µl DNS-Waschpuffer auf die Säule gegeben und diese erneut für eine Minute zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wird verworfen. Der Waschschrift wird noch einmal wiederholt. Die Zentrifugensäule wird durch zweiminütiges zentrifugieren getrocknet.

Zur Elution der DNS wird die Zentrifugensäule in ein sauberes Zentrifugenröhrchen (1,5 ml) gestellt, mit 50 µl sterilem, deionisiertem Wasser

befüllt und für eine Minute zentrifugiert. Der DNS-Gehalt kann anschließend durch eine Agarosegelelektrophorese bestimmt werden.

2.6.2 NucleoSpin® Extract Kit

Das NucleoSpin® Extract Kit (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) kann sowohl zur Aufreinigung von PCR-Produkten als auch zur Extraktion von DNS aus einem Agarosegel verwendet werden.

Protokoll zur Aufreinigung von PCR-Produkten :

Das PCR-Produkt wird mit vier Teilen NT2-Puffer gemischt. Ein NucleoSpin® Extract-Zentrifugenröhrchen wird in ein Sammelröhrchen (2 ml) gestellt, mit der Probe gefüllt und für eine Minute bei 13000 x *g* zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wird verworfen. Zum Waschen der DNS werden 600 µl NT3-Puffer auf die Säule gegeben und erneut eine Minute bei 13000 x *g* zentrifugiert, der Säulendurchfluss wird verworfen. Danach werden 200 µl NT3-Puffer in die Säule pipettiert und für zwei Minuten bei 13000 x *g* zentrifugiert. Zur Elution der DNS wird die Säule in ein neues Eppendorfgefäß (1,5 ml) gestellt und mit 50 µl NE-Elutionspuffer gefüllt. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute bei Raumtemperatur wird die Säule in dem Eppendorfgefäß bei 13000 x *g* zentrifugiert. Der DNS-Gehalt kann anschließend durch eine Agarosegelelektrophorese bestimmt werden.

Protokoll zur DNS-Extraktion aus Agarosegelen:

Die gewünschte Bande wird mit einem sauberen Skalpell über dem UV-Licht aus dem Agarosegel geschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und gewogen. Pro 100 mg Agarosegel werden 300 µl NT1-Puffer hinzugefügt. Die Probe wird dann bei 50°C 5 bis 10 Minuten bis zur vollständigen Auflösung des Gels inkubiert. Regelmäßiges vortexen beschleunigt diesen Vorgang.

Um die DNS an die Säulenmembran zu binden, wird die Säule in ein Eppendorfgefäß (2 ml) gestellt und für eine Minute bei 8000 x *g* zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Zum Waschen der DNS werden zunächst 600 µl NT3-Puffer auf die Säule gegeben und diese wird erneut für eine Minute

bei 11000 x *g* zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Im zweiten Waschschrift wird 200 µl NT3-Puffer auf die Säule pipettiert und diese bei 11000 x *g* zentrifugiert.

Zur Elution der DNS aus der Säulenmembran wird die Säule in ein sauberes Eppendorfgefäß (1,5 ml) gestellt, mit 50 µl NE-Elutionspuffer gefüllt und für eine Minute bei 11000 x *g* zentrifugiert.

2.7 Transformation in *E. coli*

Zur Vervielfältigung der Plasmide wird das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) als Expressionssystem ausgewählt.

Für die Transformation werden 75 µl *E.coli*-DH5α-Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Benjamin Mordmüller, Institut für Tropenmedizin, Tübingen) eingesetzt. Die kompetenten Zellen werden mit 1 µl Plasmid-DNS vermischt. Zum Einbringen der Plasmid-DNS in die Bakterienzelle wird der gesamte Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Ansatz für 90 Sekunden auf 42°C erhitzt, um die Aufnahme der DNS in die Zelle zu erhöhen. Danach werden die Zellen für drei Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit 450 µl SOB-Medium (s. 2.1.7) versetzt.

Zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz wird der Transformationsansatz 60 Minuten bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Um plasmidtragende Klone zu selektionieren, werden 50 µl des Ansatzes auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten (s. 2.1.2) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die verwendeten Plasmide kodieren für eine Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin, so dass die Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben, sich auf den antibiotikahaltigen Agarplatten vermehren können. Alle anderen Zellen werden durch das Antibiotikum am Wachstum gehindert.

2.8 Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNS aus Bakterien

2.8.1 Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNS

Für die Isolierung von bis zu 25 µg Plasmid-DNS wird das E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab Biotechnology, Erlangen, Deutschland) verwendet. Dieses Kit basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse mit nachfolgender DNS-Adsorption an einer Silikanmembran.

Für die Präparation der Plasmide werden 3 ml LB-Medium mit einer das Plasmid enthaltenden Bakterienkolonie beimpft und bei 37°C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. 2 ml dieser Übernachtskultur werden in ein Eppendorfgefäß überführt und eine Minute bei 13000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das erhaltene Bakteriensediment in 250 µl Lösung I (RNAse A) resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Lösung II werden die Zellen lysiert. Um eine Denaturierung der DNS zu verhindern, werden weitere 350 µl Lösung III zugesetzt. Der Ansatz wird für 10 Minuten bei 13000 x *g* zentrifugiert.

Der plasmidhaltige Überstand wird auf eine HiBind[®]-Miniprep-Zentrifugensäule gegeben und für eine Minute bei 13000 x *g* zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die nun gebundene Plasmid-DNS wird mit 500 µl HB-Puffer gewaschen und für eine Minute bei 13000 x *g* zentrifugiert. Im zweiten Waschschrift wird 750 µl DNS-Waschpuffer auf die Säule gegeben und bei 13000 x *g* zentrifugiert. An den Waschschrift schließt sich eine Trocknung der Silikanmembran an, die für zwei Minuten bei 13000 x *g* durchgeführt wird.

Zur Elution der DNS wird die Zentrifugensäule in ein sauberes Eppendorfgefäß gestellt, mit 50 µl Aqua dest. befüllt und für eine Minute bei 13000 x *g* zentrifugiert.

2.8.2 Isolierung großer Mengen Plasmid-DNS

Für die Präparation von bis zu 500 µg Plasmid-DNS wird das QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet. Für die Präparation der Plasmide werden 3 ml LB-Medium mit einer das Plasmid enthaltenden Bakterienkolonie beimpft und bei 37°C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert.

Der Ansatz der Übernachtskultur wird in 300 ml LB-Medium gegeben und erneut bei 37°C auf einem Schüttler über Nacht inkubiert.

Die Übernachtskultur wird für 20 Minuten bei 4400 x *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das erhaltene Bakteriensediment wird mit 10 ml P1-Puffer resuspendiert. Dazu werden 10 ml P2-Puffer gegeben. Der Ansatz wird 4 bis 6 Mal invertiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 10 ml des zuvor auf 4°C gekühlten P3-Puffers hinzugefügt, der Ansatz wird invertiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei wird das Lysat mit Kaliumacetat neutralisiert. Zelldebris, Proteine und chromosomale DNS präzipitieren durch die hohe Salzkonzentration als Salz-Detergenz-Komplex. Die kleinere Plasmid-DNS renaturiert und bleibt in Lösung. Der flockige Ansatz wird nun für 45 Minuten bei 4400 x *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Falcon-Röhrchen (50 ml) gegeben und erneut für 45 Minuten bei 4400 x *g* und 4°C zentrifugiert, das Pellet wird verworfen.

Während der Zentrifugation wird ein QIAGEN-tip 500 vorbereitet, indem man dieses mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert. Der Überstand des zentrifugierten Ansatzes wird nun auf das QIAGEN-tip gegeben. Nach vollständigem Durchlaufen des Ansatzes wird das QIAGEN-tip zwei Mal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen. Um die DNS aus der Säule zu eluieren, wird die Säule in ein neues Falcon-Röhrchen (50 ml) gestellt und mit 15 ml QF-Puffer befüllt. Die DNS im Eluat wird durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol ausgefällt und dann für 30 Minuten bei 4400 x *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt, das DNS-Pellet mit 5 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und 15 Minuten bei 4400 x *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt. Damit das Ethanol verdunstet wird das DNS-Pellet für 5 bis 10 Minuten an der Luft getrocknet. Das DNS-Pellet wird in 200-300 µl Aqua dest. gelöst.

2.8.3 Konzentrationsbestimmung von DNS-Lösungen

Die Ermittlung der DNS-Konzentration in den Proben erfolgt durch Extinktionsmessung mit dem Nano Drop Spektrometer (Nano Drop Technologies, Montchamin, USA) bei 260 nm.

2.9 Einfügen einer Punktmutation in ein Plasmid

Für die Insertion einer Punktmutation in ein Plasmid mittels PCR wird das QuikChange® XL Site-Mutagenesis Kit (Stratagene Cloning Systems, La Jolle, USA, s.Abb. 4) verwendet. Als Matrize dient ein doppelsträngiger Vektor. Die zwei ca. 30 Basenpaare langen Primer JuttMutF und JuttMutR (s.Tab. 3), die komplementär zueinander und zu dem zu mutierenden Locus im Plasmid sind, lagern sich während der PCR an das denaturierte Plasmid an.

Der jeweils neu synthetisierte Strang enthält den Primer und damit die gewünschte Mutation. Nach einigen Zyklen entstehen hauptsächlich Plasmide, die die gewünschte Mutation enthalten. Details zur Mutagenese-PCR sind in Tabelle 4 enthalten.

Mutagenese-PCR

(Ansatz 50 µl):

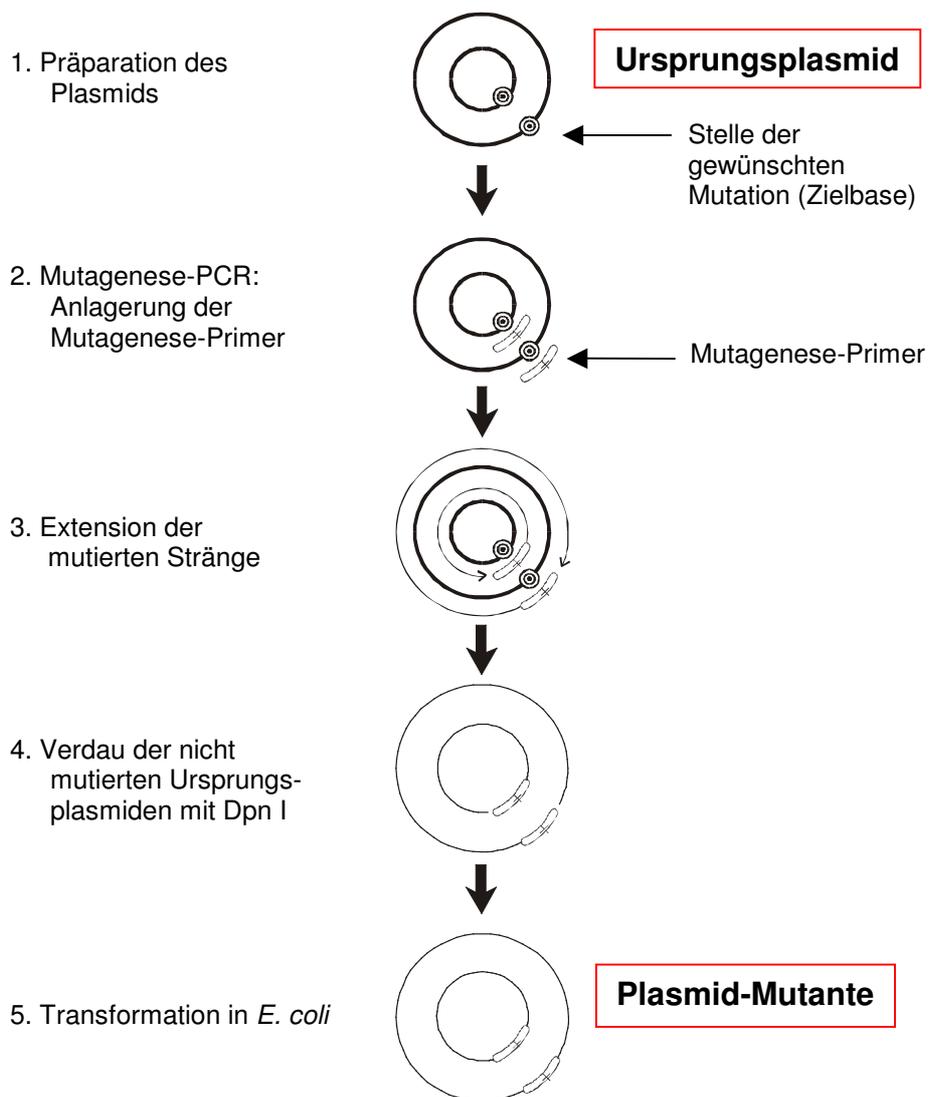
10xReaktionspuffer	5 µl
dNTPs	1 µl
JuttMutF (Primer 1)	(125 ng) 1,25 µl
JuttMutR (Primer 2)	(125 ng) 1,25 µl
Template DNS	(10 ng) 1 µl
Aqua dest.	37,5 µl
PfuTurbo DNS Polymerase	1 µl

Tabelle 4: Mutagenese-PCR

Phase	Vorgang	Temperatur (°C)	Dauer	
1.	Primärdenaturierung	95	1 Minute	
2.	Denaturierung	95	50 Sekunden	38 Zyklen
	Hybridisierung	60	50 Sekunden	
	Polymerisation	68	8 Minuten	
3.	Extension	68	7 Minuten	

Nach der Mutagenese-PCR wird die Probe mit 1 µl Dpn I verdaut, um die nicht mutierten Ursprungsplasmide aus der Probe zu entfernen. Die Restriktionsendonuklease Dpn I schneidet nur methylierte DNS und somit nur Plasmide die von Bakterien gebildet worden sind und nicht die durch die PCR synthetisierten. Dieser Ansatz wird eine Minute zentrifugiert und dann für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Probe in *E. coli* transformiert (s. 2.5). Von den Kolonien wird eine Mini-Präparation (s. 2.8.1) angefertigt. Die gewonnene DNS wird mit dem E.Z.N.A.[®] Cycle-Pure Kit (s. 2.6.1) gereinigt und sequenziert (s. 2.10).

Abbildung 4: Prinzip des QuikChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit



2.10 Sequenzierung von DNS

Zur Überprüfung der genauen Basenabfolge eines DNS-Stückes wird eine DNS-Sequenzierung durchgeführt. Für die Sequenzierung doppelsträngiger DNS wird die Kettenabbruchmethode nach Sanger verwendet (38).

Man gibt dem Reaktionsgemisch Didesoxyribonukleotidtriphosphate (ddNTP) zu, an die, wenn sie in ein DNS-Molekül eingebaut worden sind, die DNS-Polymerase kein weiteres NTP mehr anhängen kann und es somit zu einem Kettenabbruch an definierten Positionen kommt. Dadurch entstehen unterschiedlich lange DNS-Moleküle, die abhängig von ihrer letzten Base unterschiedlich fluoreszieren. Diese DNS-Moleküle werden mit Hilfe eines Sequenziergerätes aufgetrennt. Die unterschiedlichen Fluoreszenzen, und somit die korrespondierenden Basen, werden darin mit einem Laser detektiert.

2.10.1 Sequenzierungsreaktion

Für die Sequenzierungsreaktion wird Matrizen-DNS in einer Konzentration von 3 ng eingesetzt. In ein Eppendorfgefäß werden 10 pmol (0,5 µl) gereinigte Oligonukleotide Juta-1 und Juta-2 und 2 µl BigDye Terminator Reaktionsmix (Applied Biosystems, Foster City, USA) sowie die Matrizen-DNS gegeben. Der Reaktionsansatz wird mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Anschließend wird der Ansatz in einem Hybaid Omn-E (ThermoLife Science) inkubiert. Wie bei der Polymerasekettenreaktion erfolgt die Inkubation in drei Schritten (s.Tab. 5).

Tabelle 5: Sequenzierungsreaktion

Phase	Vorgang	Temperatur (°C)	Dauer	
1.	Primärdenaturierung	95	1 Minute	
2.	Denaturierung	96	30 Sekunden	40 Zyklen
	Hybridisierung	50	15 Sekunden	
	Polymerisation	60	4 Minuten	
3.	Extension	68	7 Minuten	

2.10.2 Aufreinigung der Produkte der Sequenzierungsreaktion

Die Reaktionsprodukte werden mit CENTRI-SEP-Säulen (Princeton Separations, Adelphia, USA) nach der Sequenzierungsreaktion von den überschüssigen Nukleotiden, Salzen und anderen Pufferkomponenten gereinigt.

Die Matrix der Säulen wird in die Spitze geklopft und mit 800 µl Aqua dest. rehydriert. Anschließend wird die Säule kurz geschüttelt, und die entstandenen Luftblasen werden durch leichtes Antippen mit dem Finger entfernt. Das nun entstehende Gel wird 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation werden Deckel und Endkappe entfernt, so dass überschüssige Flüssigkeit in ein Sammelröhrchen ablaufen kann. Tropft keine Flüssigkeit mehr aus der Säule, wird diese bei 3000 x *g* zwei Minuten zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen, die Säule wird erneut bei 3000 x *g* für zwei Minuten zentrifugiert.

Die Säule wird in ein sauberes Eppendorfgefäß gestellt, und das Produkt der Sequenzierungsreaktion wird vorsichtig auf das Gel gegeben. Die Säule wird erneut bei 3000 x *g* zwei Minuten zentrifugiert. Die Probe kann jetzt der Sequenziererelektrophorese zugeführt werden.

2.10.3 Sequenziererelektrophorese

Die Sequenziererelektrophorese wurde mit dem Sequenziergerät Genetic Analyser ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, USA) von Andrea Weierich und Silvelia Grummes durchgeführt.

2.11 Restriktion von DNS

Zur Kontrolle und Analyse von Plasmiden sowie zur Einbringung von Fremd-DNS in Vektoren werden die entsprechenden Vektoren und PCR-Amplifikate mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen verdaut. Diese schneiden die DNS aufgrund ihrer Spezifität an ganz bestimmten Basensequenzmustern, so dass ein oder mehrere DNS-Fragmente entstehen. Nach der Restriktion werden die

Proben zur Kontrolle auf ein Agarosegel (s. 2.1.2) aufgetragen und mit dem E.Z.N.A.[®] Cycle-Pure Kit (s. 2.6.1) aufgereinigt.

2.11.1 Restriktion eines Vektors

Für den Verdau des Plasmids SPHA (s. 2.2) werden 10 µl Plasmid-DNS in einem Reaktionsvolumen von 20 µl, welchem 1 µl Xho1-Restriktionsenzym, 1 µl BamH1-Restriktionsenzym (beide New England Biolabs, Beverly, USA) sowie 2 µl 10xReaktionspuffer (New England Biolabs, Beverly, USA) und 6 µl Aqua dest. zugesetzt sind, zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Xho1 und BamH1 schneiden die Plasmid DNS jeweils nur an einer Stelle, sodass insgesamt zwei DNS Fragmente entstehen.

2.11.2 Restriktion von DNS-Fragmenten

Die Fragmente für die Ligation (s. 2.12) werden aus dem jeweiligen Wildtyp- bzw. Mutanten-Plasmid mittels PCR (s. 2.3) gewonnen. Die hier verwendeten Primer sind Bam-Tlr2-F und Xho-Tlr2-R. Die PCR-Fragmente werden zusätzlich ebenfalls mit zwei Restriktionsenzymen verdaut, so dass die entstehenden Enden der Fragmente genau an die zuvor restringierten Vektorfragmente (s. 2.11.1) von SPHA passen.

Für die Restriktion von 50 µl DNS-Fragment werden je 2 µl BamH1- und Xho1-Restriktionsenzym, 6 µl 10xReaktionspuffer und 2 µl BSA (alle New England Biolabs, Beverly, USA) verwendet und ebenfalls für zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

2.12 Ligation von DNS-Fragmenten in Plasmide (Klonierung)

Für die Ligation von DNS-Fragmenten in den entsprechenden Vektor wird das Enzym T4-DNS-Ligase (New England Biolabs, Beverly, USA) verwendet. Um die Ligation von aufgereinigten PCR-Amplifikaten mit einem Plasmid zu ermöglichen, ist es notwendig, Amplifikat und Vektor mit dem jeweils gleichen Restriktionsenzym zu verdauen (s. 2.11).

Für die Ligationsreaktion werden der vorverdaute Vektor SPHA und das jeweilige Insert (Amplifikat) des *TLR2* in Wildtyp- oder Mutantenvariante im Verhältnis von 1:7,5 eingesetzt. Dem Reaktionsansatz werden zusätzlich zu dem Vektor und dem Insert noch 1 µl 10-fach Ligasepuffer (New England Biolabs, Beverly, USA) und 0,5 µl T4-DNS-Ligase zugegeben. Der Reaktionsansatz wird für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in *E. coli* transformiert (s. 2.7).

2.13 HEK293-Zellkultur

Alle Arbeiten an den Zellkulturen werden an einer Sterilbank (HERA safe, Heraeus Instruments, Hanau) durchgeführt. Die humanen embryonalen Nieren-(HEK)293-Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Benjamin Mordmüller, Institut für Tropenmedizin, Tübingen) werden in DMEM-Medium (Cambrex, Apen, Deutschland) mit 1%-igem Glutamat (GIBCO, Karlsruhe, Deutschland), 1%-igem Penicillin/Streptomycin und 10%-igem FCS („fetal calf serum“, GibCo™ Invitrogen, Carlsbad, USA) im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert.

2.13.1 Auftauen der Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen werden im Wasserbad bei 37°C aufgewärmt und schnell in 10 ml Medium, ebenfalls auf 37°C erwärmt, pipettiert. Die Zell-Medium-Suspension wird vorsichtig in eine Zellkulturflasche (75 ml³) überführt und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert. Am nächsten Tag wird das Medium der Zellkultur gewechselt, um nicht adhärente Zellen zu entfernen.

2.13.2 Aussäen der Zellen

Alle zwei Tage wird das Kulturmedium in der Zellkulturflasche gewechselt. Bei konfluiertem Zellrasen müssen die Zellen verdünnt werden.

Hierzu wird das Kulturmedium entfernt, und die Zellen werden mit 5 ml 1xPBS (s. 2.1.3) gewaschen. Zur Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche und zur Lösung der Zell-Zellkontakte werden die Zellen mit 2 ml Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) 3-5 Minuten bis zu ihrer Suspension bei 37°C inkubiert. Dieser enzymatische Vorgang wird mit der Zugabe von 10 ml serumhaltigem DMEM (Cambrex, Apen, Deutschland) beendet. Nachdem die Konzentration der Zellen in der Suspension ermittelt worden ist (s. 2.13.3), können die Zellen auf weitere Kulturflaschen verteilt oder anderweitig verwendet werden.

2.13.3 Konzentrationsbestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension

Zur Bestimmung der Konzentration in der Zellsuspension wird ein Aliquot der Zellsuspension mit Tryptan-Blau-Lösung im Verhältnis 10:1 gemischt, für kurze Zeit bei Raumtemperatur inkubiert und dann in der Neugebauer-Kammer ausgezählt. Die Zellzahl in drei äußeren Quadranten wird ermittelt und davon der Durchschnitt berechnet. Anhand des Durchschnitts kann die Zellkonzentration (Durchschnitt Zellzahl x 1,1 x 10⁴Zellen/ml) ermittelt werden.

2.14 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Ziel einer Transfektion ist die Einschleusung von Fremd-DNS in den Zellkern der jeweiligen Zelle, um die Expression des Fremd-Gens durch die Zelle zu ermöglichen. Werden die Gene nur für einige Tage exprimiert, spricht man von einer transienten Transfektion, bei einer stabilen Transfektion dagegen wird das eingeschleuste Expressionsplasmid in die chromosomale DNS integriert.

In dieser Arbeit dient die Kalziumphosphatpräzipitation als Methode zur Transfektion. Dabei wird DNS mit Kalziumchlorid und einer phosphathaltigen Pufferlösung gemischt, wodurch es zur Bildung von DNS-Kalziumphosphat-

kristallen kommt (s.Abb. 5). Diese Kristalle schlagen sich bei Kontakt mit einer Zelle auf deren Oberfläche nieder, so dass die DNS über Endozytose in die Zelle gelangen kann.

2.14.1 Kalziumphosphatpräzipitation

Am Tag vor der Transfektion werden ca. 2×10^5 Zellen pro Vertiefung in eine 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Am Tag der Transfektion wird das Zellkulturmedium vor der Transfektion gewechselt.

Es werden entweder 1,2 μg des leeren Expressionsvektors pcDNA3, des NIK(NF- κ B-induzierende Kinase)-Plasmids oder des TLR2-kodierenden Plasmids als Wildtyp oder Mutante mit jeweils 0,5 μg Firefly-Luciferase-Reporter-Plasmid, zur Bestimmung der NF- κ B-Aktivität, und jeweils 0,1 μg Renilla-Reporter-Plasmid, zur Normalisierung der Transfektionseffizienz, kotransfiziert (s. Tab. 1).

Der Expressionsvektor pcDNA3 dient als Negativkontrolle, NIK dagegen als Positivkontrolle, da die Kinase bei Überexpression konsekutiv aktiv ist und zur NF- κ B-Aktivierung führt.

150 μl 2xHBS (s. 2.1.6) werden in einem Eppendorfgefäß (1,5 ml) vorgelegt. In einem Eppendorfgefäß (0,5 ml) werden 2 μg Gesamt-DNS und 18,5 μl Kalziumchlorid (2 M) vorgelegt und mit sterilem Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 150 μl angefüllt. Das DNS-Kalziumchloridgemisch wird dann unter vorsichtigem Mischen langsam auf das im Eppendorfgefäß vorgelegte 2xHBS geträufelt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Gemisch jeweils eines Eppendorfgefäßes (1,5 ml) in jeweils ein Loch der 6-Loch-Zellkulturplatte auf die Zellen gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wird das Transfektionsmedium aus den Vertiefungen entfernt und ein Luziferase-Assay (s. 2.15) durchgeführt.

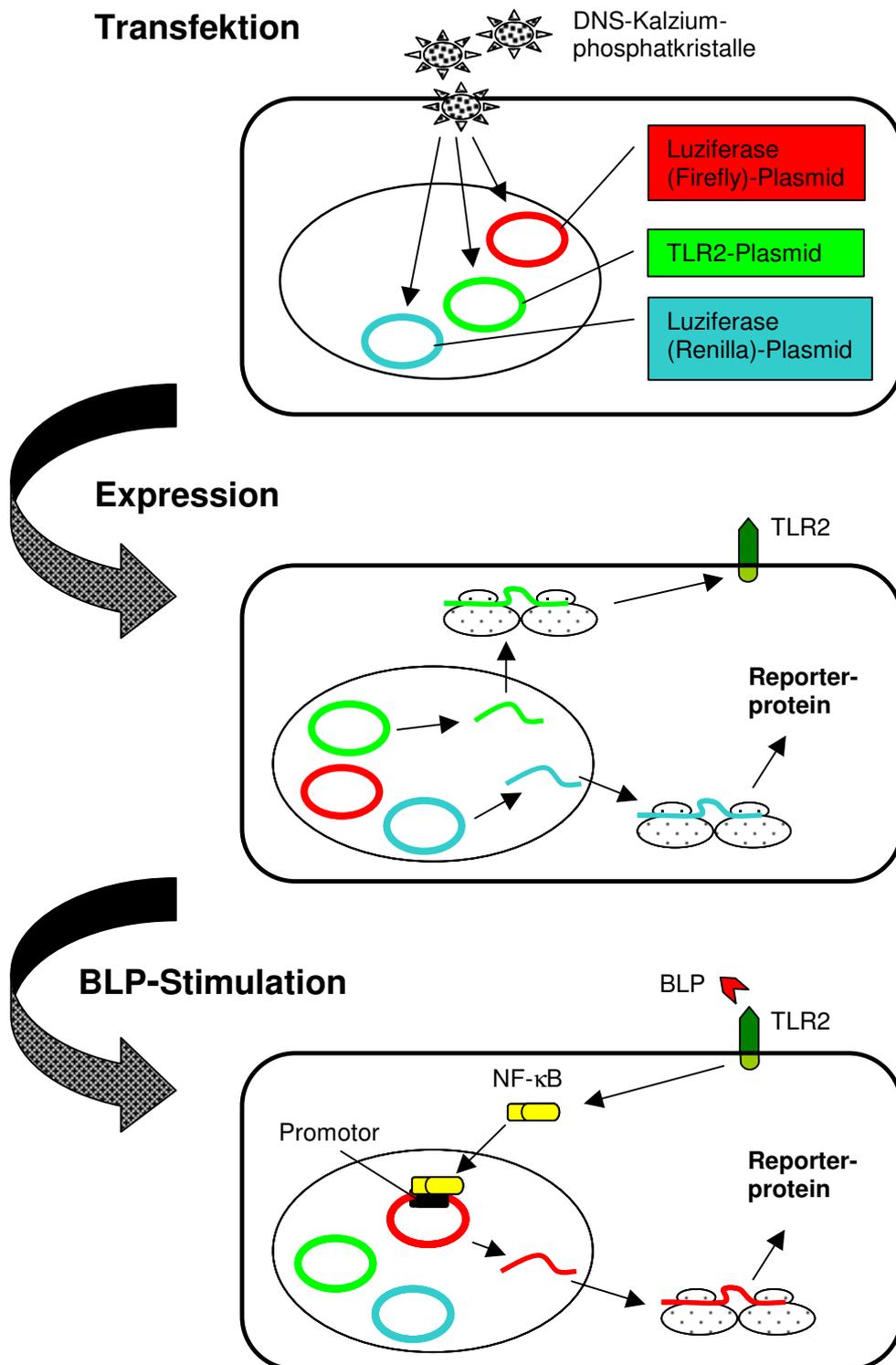
2.14.2 Kontrolle der Transfektion

Die Kontrolle der Transfektion erfolgt mit einem für GFP (Grün-fluoreszierendes Protein) kodierenden Plasmid (pEGFP-C1, s.Tab. 1) wie in 2.14.1 beschrieben. Am Tag nach der Transfektion wird das Medium entfernt, die Zellen mit 1 ml PBS (s. 2.1.3) gewaschen, trypsinisiert und bei 3000 x *g* für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert. 10 µl der Suspension werden auf einen Objektträger gegeben und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Zellen, die den pEGFP-C1-Vektor aufgenommen haben, fluoreszieren grün.

2.14.3 Stimulation der HEK293-Zellen

Am Tag nach der Transfektion werden die HEK293-Zellen mit bakteriellem Lipoprotein (BLP) (Microcollections, Tübingen, Deutschland), 1:1000 mit Aqua dest. verdünnt, für sechs Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend mit PBS (s. 2.1.3) gewaschen. Die charakteristische N-terminale Lipoamino-Säure N-acetyl-S-diacylglyceryl-cystein des bakteriellen Lipoproteins ist essentiell für deren Aktivierung von TLR2. Synthetisch hergestellte BLP-Analoga bestehen aus einer palmylierten Version der N-acetyl-S-diacylglyceryl-cystein-Säure (Pam₃-Cys) und einigen C-terminalen Aminosäuren.

Abbildung 5: Prinzip der Kalziumphosphattransfektion und Stimulation des TLR2 mit BLP unter Anwendung des Luziferase Reporter Assay in HEK293-Zellen



2.15 Luziferase Reporter Assay System

Beim Luziferase-System dient ein Biolumineszenz hervorrufendes Gen als Reporter (s.Abb. 5). Die Reportergene werden mit den zu untersuchenden Plasmiden kotransfiziert (s. 2.14.1). Wenn Luziferase in den transfizierten Zellen als Reporterprodukt hergestellt wird, kann dessen Aktivität durch eine Biolumineszenzreaktion in den Zelllysaten gemessen werden.

Der Luziferase-Assay wird mit dem Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega, Madison, USA) durchgeführt. In diesem Assay werden zwei verschiedene Luziferasen in einem System simultan exprimiert und gemessen. Die Aktivitäten der eingesetzten Reportergene Firefly-Luziferase (experimenteller Reporter) und Renilla-Luziferase (Kontroll-Reporter) werden nacheinander gemessen. Die Induktion der Firefly-Luziferase ist abhängig von den jeweiligen Versuchsbedingungen, in dieser Arbeit wird die Firefly-Luziferase durch NF- κ B aktiviert. Die Renilla-Luziferase dient als interne Kontrolle durch ihre Grundaktivität (s.Abb. 5).

Am Tag nach der Transfektion wird in jede Vertiefung der 6-Loch Platte 500 μ l PLB (Passive Lysis Buffer, Promega, Madison, USA) pipettiert. Die Platte wird für 30 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Nach vollständiger Lyse der Zellen wird das Lysat in ein Eppendorfgefäß (1,5 ml) pipettiert und für 30 Sekunden bei 13000 x *g* zentrifugiert, um das Lysat von zurückgebliebenen Zelldebris zu reinigen. Das Lysat wird in ein neues Eppendorfgefäß (1,5 ml) gegeben. Das Luziferase-Assay-Reagent II und das Stop&Glo Reagenz werden bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend in das Injektionssystem des Luminometers gegeben.

Von jeder Zelllysatsprobe werden 20 μ l in ein Luminometerröhrchen pipettiert, sofort in das Luminometer hineingestellt und die Messung durchgeführt. Für die Aktivitätsmessung des Firefly-Luziferase-Gens wird den Proben Luziferase-Assay Reagent II (Lar II) automatisch durch das Luminometer injiziert. Bei der Messung wird Licht in einer Wellenlänge von 562 nm emittiert und mit dem Luminometer (Sirius Luminometer, Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim, Deutschland) in relativen Lichteinheiten (rel. LE) gemessen. Im nächsten Schritt wird der Probe Stop&Glo Reagenz zugegeben. Dieses stoppt

die Firefly-Luziferase-Reaktion und startet gleichzeitig die Renilla-Luziferase-Reaktion, die wie die Firefly-Luziferase vermessen wird. Die erhaltenen Firefly-Luziferasewerte werden zur Normalisierung der Transfektionseffizienz durch die Renilla-Luziferasewerte dividiert und als relative Luziferaseaktivität (rLA) angegeben.

Das Luminometer wird wie folgt programmiert:

Injektion 1 (Lar II)	100 µl
Verzögerung zwischen Injektion 1 und Messung 1	1 Sekunde
Messung 1 (Firefly Luziferase)	10 Sekunden
Injektion 2 (Stop&Glo)	100 µl
Verzögerung zwischen Injektion 2 und Messung 2	1 Sekunde
Messung 2 (Renilla)	10 Sekunden

2.16 Verwendete Proben

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben wurden im Rahmen einer von Van Den Biggelaar et. al. durchgeführten klinischen Studie gewonnen (46).

2.17 Statistische Analyse

Die gewonnenen Daten aus den Luziferasemessungen werden mit dem ANOVA-Test, korrigiert nach Bonferroni/Dunnett, und dem Kruskal/Wallis-Test im Programm StatView analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Sequenzierung des zweiten Exons des *TLR2*

Die Sequenzierung des zweiten Exons des *TLR2*, das den gesamten codierenden Bereich umfasst, wurde im Max-Dellbrück-Center in Berlin in Auftrag gegeben. Die Proben wurden im Rahmen einer klinischen Studie in Gabun (Westafrika) entnommen. Insgesamt sind 47 Proben sequenziert worden. Sechs Polymorphismen wurden detektiert, diese befinden sich alle in der extrazellulären Domäne des Rezeptors (s.Abb. 6 und Abb. 7). Es handelt sich jeweils um Polymorphismen einzelner Nukleotide. Führen diese Nukleotidpolymorphismen zu keinem Aminosäureaustausch, nennt man diese synonyme Polymorphismen. Verändert sich jedoch die Basenabfolge derart, dass dieses zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führt, spricht man von nicht-synonymen Polymorphismen.

Vier der Polymorphismen sind synonym (G38G, N119N, S450S, L542L) und scheinen daher keine funktionelle Relevanz zu besitzen. Zwei Nukleotidpolymorphismen, die jeweils zu einem Austausch der Base Guanin gegen Adenin führen, bewirken jeweils einen Aminosäureaustausch von Histidin zu Arginin (H571R, H579R). Des Weiteren wurden die Polymorphismen mit der Datenbank, generiert von der Universität von Arizona, verglichen. Dieser Vergleich ergab, dass bis auf H571R alle detektierten Polymorphismen bereits bekannt sind (http://www.innateimmunity.net/LLPGA2/index_html).

Der Polymorphismus H571R wird somit in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben. Diese Mutation (H571R) konnte insgesamt in 5 von 46 Proben in heterozygoter Form nachgewiesen werden. Die Frequenz dieses Allels beträgt 5,43%. Die Allelfrequenzen der fünf anderen Polymorphismen liegen zwischen 1,06% und 29,79% (s.Tab. 6).

Abbildung 6: Zweites Exon des TLR2

Die Abfolge der Kleinbuchstaben steht für die unterschiedlichen Basen (a=Adenin, c=Cytosin, g=Guanin und t=Thymin), die Großbuchstaben für aus Basentriplets, bestehend aus drei Positionen, gebildete Aminosäuren (s. nachfolgende Tabelle).

1. Position	2. Position				3. Position
	t	c	a	g	
t	Phenylalanin (F)	Serin (S)	Tyrosin (Y)	Cystein (C)	t
	Phenylalanin (F)	Serin (S)	Tyrosin (Y)	Cystein (C)	c
	Leucin (L)	Serin (S)	Stopp (*)	Stopp (*)	a
	Leucin (L)	Serin (S)	Stopp (*)	Tryptophan (W)	g
c	Leucin (L)	Prolin (P)	Histidin (H)	Arginin (R)	t
	Leucin (L)	Prolin (P)	Histidin (H)	Arginin (R)	c
	Leucin (L)	Prolin (P)	Glutamin (Q)	Arginin (R)	a
	Leucin (L)	Prolin (P)	Glutamin (Q)	Arginin (R)	g
a	Isoleucin (I)	Threonin (T)	Asparagin (N)	Serin (S)	t
	Isoleucin (I)	Threonin (T)	Asparagin (N)	Serin (S)	c
	Isoleucin (I)	Threonin (T)	Lysin (K)	Arginin (R)	a
	Methionin (M)	Threonin (T)	Lysin (K)	Arginin (R)	g
g	Valin (V)	Alanin (A)	Asparaginsäure (D)	Glycin (G)	t
	Valin (V)	Alanin (A)	Asparaginsäure (D)	Glycin (G)	c
	Valin (V)	Alanin (A)	Glutaminsäure (E)	Glycin (G)	a
	Valin (V)	Alanin (A)	Glutaminsäure (E)	Glycin (G)	g

Die detektierten Genmutationen sind farbig hervorgehoben. Gelb unterlegt sind die synonymen, grün die nicht-synonymen Mutationen. Die Ziffern beschreiben die Basenpaarposition innerhalb des zweiten Exons des *TLR2*.

```

          10                30                50
atgccacatactttgtggatggtgtgggtcttgggggtcatcatcagcctctccaaggaa
M P H T L W M V W V L G V I I S L S K E

          70                90                110
gaatcctccaatcaggcttctctgtcttgtgaccgcaatggtatctgcaagggaagctca
E S S N Q A S L S C D R N G I C K G S S
                                     G

```

130 150 170
 ggatctttaaactccattccctcagggctcacagaagctgtaaaaagccttgacctgtcc
 G S L N S I P S G L T E A V K S L D L S

190 210 230
 aacaacaggatcacctacattagcaacagtgacctacagaggtgtgtgaacctccaggct
 N N R I T Y I S N S D L Q R C V N L Q A

250 270 290
 ctggtgctgacatccaatggaattaacacaatagaggaagattctttttcttccctgggc
 L V L T S N G I N T I E E D S F S S L G

310 330 350
 agtcttgaacatttagacttatacctataattacttatctaatttatcgcttctctggttc
 S L E H L D L S Y N Y L S N L S S S W F

370 390 410
 aagcccccttcttctttaacattcttaaaacttactgggaaatccttacaaaaccctaggg
 K P L S S L T F L N L L G N P Y K T L G

430 450 470
 gaaacatctctttttctcatctcacaaaattgcaaactcctgagagtgaggaaatgatggac
 E T S L F S H L T K L Q I L R V G N M D

490 510 530
 accttactaagattcaaagaaaagatthttgctggacttaccttcccttgaggaacttgag
 T F T K I Q R K D F A G L T F L E E L E

550 570 590 c
 attgatgcttcagatctacagagctatgagccaaaagtttgaagtcaattcagaaTgta
 I D A S D L Q S Y E P K S L K S I Q N V
 N

610 630 650
 agtcatctgatccttcatatgaagcagcatatthttactgctggagatthttgtagatggt
 S H L I L H M K Q H I L L L E I F V D V

670 690 710
 acaagttccgtggaatgthttggaactgagatactgatttggacactthttccattthttca
 T S S V E C L E L R D T D L D T F H F S

1330 c 1370
 ttgaacttatccagcacacgaatacacagtgtaacaggctgcattcccaagacactggaa
 L N L S S T R I H S V T G C I P K T L E
S
 1390 1410 1430
 attttagatgtagcaacaacaatctcaatttattttctttgaatttgccgcaactcaaa
 I L D V S N N N L N L F S L N L P Q L K
 1450 1470 1490
 gaactttatatttccagaaataagttgatgactctaccagatgcctccctcttacccatg
 E L Y I S R N K L M T L P D A S L L P M
 1510 1530 1550
 ttactagtattgaaaatcagtaggaatgcaataactacgttttctaaggagcaacttgac
 L L V L K I S R N A I T T F S K E Q L D
 1570 1590 1610
 tcatttcacacactgaagactttggaagctggtggcaataacttcatttgctcctgtgaa
 S F H T L K T L E A G G N N F I C S C E
g1630 1650 1670
 ttctctccttcactcaggagcagcaagcactggccaaagtcttgattgattggccagca
 F L S F T Q E Q Q A L A K V L I D W P A
L
 1690 1710 a 1730 a
 aattacctgtgtgactctccatcccattgtgcttgccagcaggttcaggatgtccgcctc
 N Y L C D S P S H V H G Q Q V Q D V H L
R R
 1750 1770 1790
 tcggtgtcggaatgtcacaggacagcactggtgtctggcatgtgctgtgctctgttctctg
 S V S E C H R T A L V S G M C C A L F L
 1810 1830 1850
 ctgatcctgctcacgggggtcctgtgccaccgtttccatggcctgtggtatatgaaaatg
 L I L L T G V L C H R F H G L W Y M K M
 1870 1890 1910
 atgtgggcctggctccaggccaaaaggaagcccaggaaagctcccagcaggaacatctgc
 M W A W L Q A K R K P R K A P S R N I C

1930 1950 1970
tatgatgcatttgtttcttacagtgagcgggatgcctactgggtggagaaccttatggtc
Y D A F V S Y S E R D A Y W V E N L M V

1990 2010 2030
caggagctggagaacttcaatcccccttcaagttgtgtcttcataagcgggacttcatt
Q E L E N F N P P F K L C L H K R D F I

2050 2070 2090
cctggcaagtggatcattgacaatatcattgactccattgaaaagagccacaaaactgtc
P G K W I I D N I I D S I E K S H K T V

2110 2130 2150
tttgtgctttctgaaaactttgtgaagagtgagtggtgcaagtatgaactggacttctcc
F V L S E N F V K S E W C K Y E L D F S

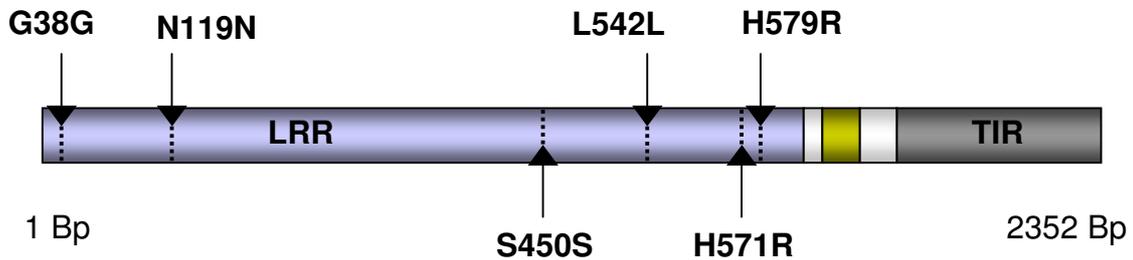
2170 2190 2210
catttccgtctttttgatgagaacaatgatgctgccattctcattcttctggagcccatt
H F R L F D E N N D A A I L I L L E P I

2230 2250 2270
gagaaaaaagccattccccagcgttctgcaagctgcggaagataatgaacaccaagacc
E K K A I P Q R F C K L R K I M N T K T

2290 2310 2330
tacctggagtggcccatggacgaggctcagcgggaaggatthttgggtaaatctgagagct
Y L E W P M D E A Q R E G F W V N L R A

2350
gcgataaagtcctag
A I K S *

Abbildung 7: Mutationen im zweiten Exon des TLR2



Bp Basenpaare (Position)
LRR Leuzinreiche Domäne
TIR Toll-/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne

G38G] Synonyme Mutationen
N119N] (Änderung in der Basenabfolge führt nicht zu einer
S450S] Änderung der Aminosäuresequenz)
L542L]

H571R] Nicht-synonyme Mutationen
H579R] (Änderung der Aminosäuresequenz von Histidin zu Arginin)

Tabelle 6: Charakteristik der 6 Polymorphismen

Die genomische Position bezieht sich auf die Referenzsequenz NT_015169; 21090bp, GI:20532468 ncbi. Die unterschiedlichen Basen für den Nukleotidaustausch sind A=Adenin, C=Cytosin, G=Guanin oder T=Thymin. Der Aminosäureaustausch H571R bzw. H579R ist Histidin (H) zu Arginin (R).

Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch	Rezeptordomäne	Allerfrequenz in %
C18733A	keiner	extrazellulär	1,06
T19216C	keiner	extrazellulär	29,79
T19969C	keiner	extrazellulär	5,43
C20235G	keiner	extrazellulär	4,35
G20331A	H571R	extrazellulär	5,43
G20355A	H579R	extrazellulär	5,56

3.2 Klonierung der TLR2-Konstrukte H571 und R571

Da es sich bei der neu entdeckten Mutation H571R um einen nicht synonymen Polymorphismus handelt, stellt sich die Frage nach der funktionellen Auswirkung dieses Nukleotidaustausches. Um dieser Frage nachzugehen, wird die Mutation zunächst konstruiert (s. 2.9) und in das Plasmid SPHA kloniert (s. 2.12). Durch die Klonierung fremder DNS-Fragmente in ein Plasmid entstehen spezifische Enzymschnittstellen. Die Restriktion der klonierten Konstrukte durch die jeweils spezifischen Enzyme bestätigt den Erfolg der Klonierung. Die für das konstruierte Plasmid, sowohl für den Wildtyp H571 als auch die Mutante R571, spezifischen Enzyme sind BamH1 und Xho1. Diese schneiden das Plasmid in zwei DNS-Fragmente.

Die Restriktionsanalyse kann mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese unter fluoreszierendem Licht dargestellt werden. Die Kontrollagarosegelelektrophorese ergibt für die Restriktion von H571 (s. Abb. 8a) und R571 (s. Abb. 8b) jeweils eine positive DNS-Probe. Durch die Restriktion sind auf dem Bild jetzt zwei DNS-Banden sichtbar (weißer Pfeil).

Des Weiteren wird der Erfolg der Klonierung zusätzlich durch die Sequenzierung der genauen Basenpaarabfolge der konstruierten Plasmide kontrolliert (s. 2.10). Es konnte jeweils ein Plasmid des Wildtyps H571 und eines der Mutante R571 rekonstruiert werden.

Abbildung 8a: Agarosegelelektrophoresebild der Restriktion von H571 mit BamH1 und Xho1

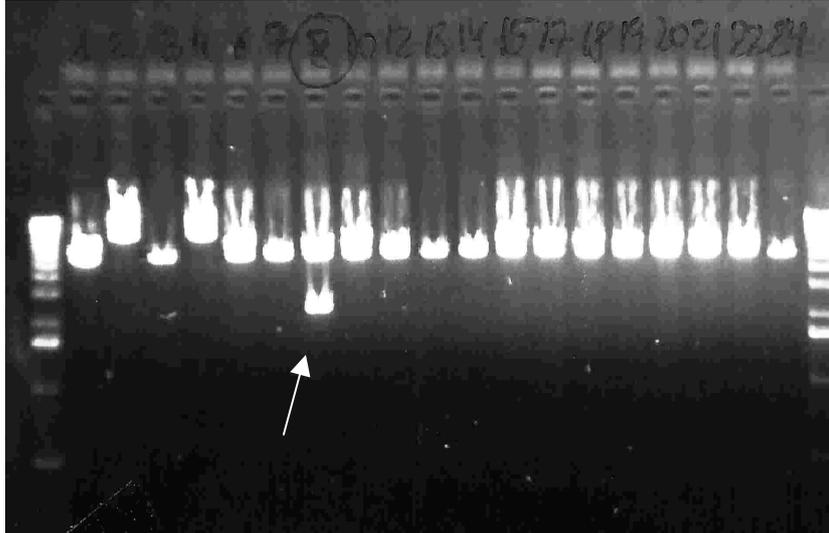
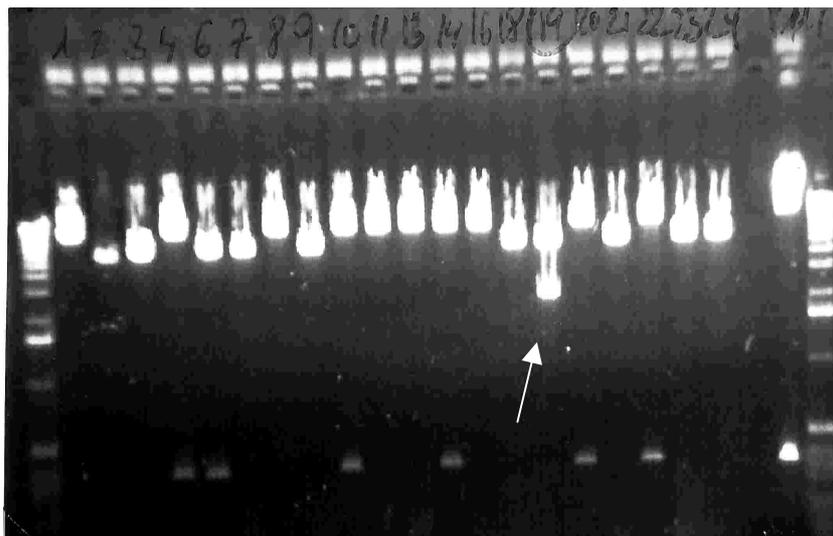


Abbildung 8b: Agarosegelelektrophoresebild der Restriktion von R571 mit BamH1 und Xho1



3.3 Die Induktion von NF- κ B durch bakterielles Lipoprotein in HEK293-Zellen

Um zu untersuchen, ob der Polymorphismus H571R des TLR2 eine funktionelle Relevanz in Bezug auf die Induktion von NF- κ B aufweist, wurden die zuvor konstruierten H571- und R571-Plasmide, Positiv- und Negativkontrollen jeweils mit dem Firefly-Luziferase-Reporter-Plasmid und dem Renilla-Reporter-Plasmid in HEK293-Nierenzellen kotransfiziert (s. 2.14).

Als Negativkontrolle dient der Expressionsvektor pcDNA3. NIK („NF- κ B-inducing kinase“) dient dagegen als Positivkontrolle, da die Kinase bei Überexpression konsekutiv aktiv ist und zur NF- κ B-Aktivierung führt.

Nach erfolgreicher Transfektion exprimieren die Zellen, abhängig vom transfizierten Plasmid, entweder den TLR2-Wildtyp H571 oder die TLR2-Mutante R571 auf der Oberfläche. Anschließend werden die Zellen mit bakteriellem Lipoprotein (BLP) stimuliert. BLP gilt als potenter Stimulus für den TLR2. Durch die Aktivierung von TLR2 wird in der Zelle eine Signalkaskade aktiviert (s. 1.2.1), die schließlich zur Induktion von NF- κ B führt. NF- κ B kann mit Hilfe des Luziferase-Assays (s. 2.15) bestimmt werden. NF- κ B führt über die Induktion von Reporterprodukten zur Aktivierung der Firefly-Luziferase. Die Aktivität der Luziferasen kann durch ein Lumineszenzmessgerät in relativer Luziferaseaktivität (rLA) bestimmt werden.

Die Experimente wurden jeweils in Tripletts an drei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt und von einer weiteren Person in gleicher Versuchsanordnung wiederholt.

3.3.1 Ergebnisse der Zellkultur

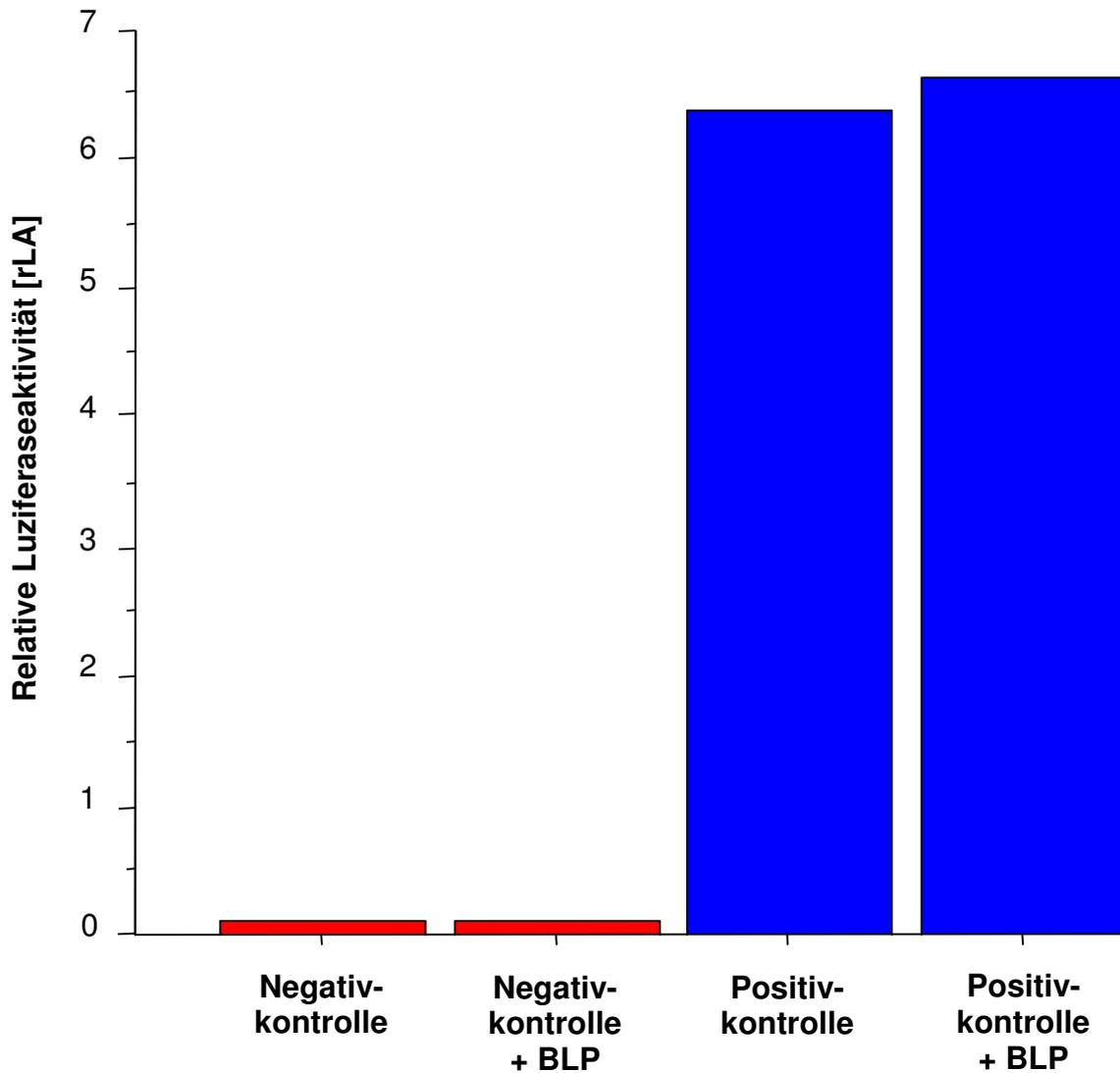
Die Zellen, die jeweils mit den Plasmiden der Positivkontrolle, des TLR2-Wildtyps und der TLR2-Mutante transfiziert wurden, waren in der Lage die Luziferaseaktivität zu induzieren. Bei der Negativkontrolle konnte wie erwartet nur eine sehr geringe, zu vernachlässigende Luziferaseaktivität nachgewiesen werden. Die Induktion der Luziferaseaktivität der Positivkontrolle ist unabhängig von der Stimulation mit BLP (s.Abb. 9).

Die gemessene Luziferaseaktivität beim TLR2-Wildtyp H571 beträgt unstimuliert im Mittel 8,387 rLA und stimuliert mit BLP 11,706 rLA. Bei der TLR2-Mutante R571 konnten unstimuliert 5,684 rLA und stimuliert mit BLP 9,065 rLA gemessen werden. Der TLR2-Wildtyp H571 induziert in unstimulierter Form die Luziferaseaktivität 1,5-fach und in stimulierter Form 1,3-fach stärker als die TLR2-Mutante R571 (s.Tab. 7 und Tab. 8).

Die erhaltenen Daten werden mit dem ANOVA-Test, korrigiert nach Bonferroni/Dunnett, sowie mit dem Kruskal/Wallis-Test ausgewertet. Der Unterschied sowohl in den unstimulierten als auch in den mit BLP stimulierten Zellkulturen ist statistisch signifikant $p < 0,001$.

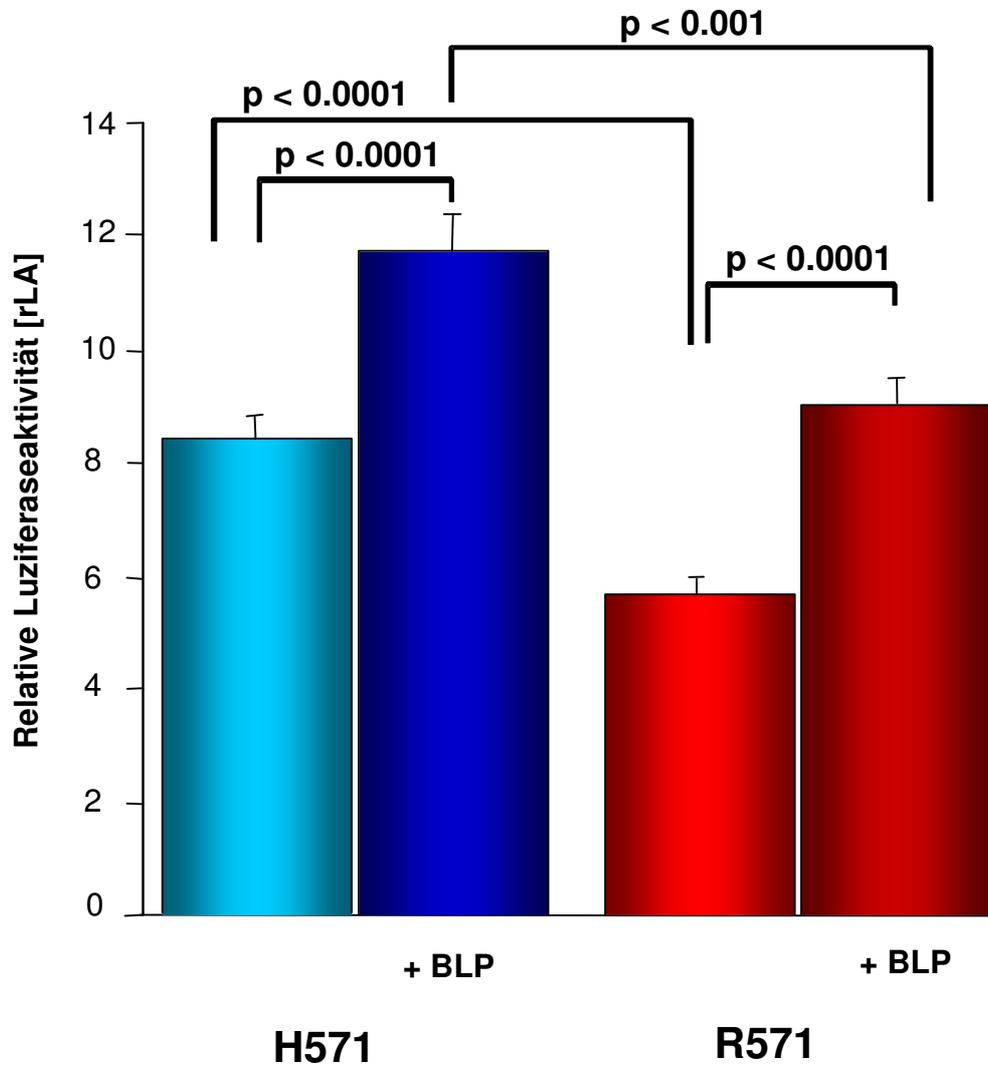
Es besteht ein signifikanter Unterschied in der Fähigkeit zur NF- κ B-Aktivierung und somit zur Induktion der Luziferaseaktivität zwischen TLR2-Wildtyp H571 und TLR2-Mutante R571. Der Wildtyp des TLR2 wird signifikant stärker durch BLP aktiviert ($p < 0,001$), was sich in einer stärkeren NF- κ B-Aktivierung und somit in einer stärkeren Luziferaseaktivität ausdrückt (s.Abb. 10).

Abbildung 9: NF- κ B-Aktivität in stimulierten und unstimulierten Kontrollproben



Die Abbildung zeigt als Negativkontrolle den Expressionsvektor pcDNA3, NIK („NF- κ B-inducing kinase“) dient dagegen als Positivkontrolle, da die Kinase bei Überexpression konsekutiv aktiv ist und zur NF- κ B-Aktivierung führt. Sowohl Negativ- als auch Positivkontrolle werden mit bakteriellem Lipoprotein (+ BLP) stimuliert, jedoch ohne signifikante Auswirkung auf die NF- κ B-Aktivität.

Abbildung 10: NF- κ B-Aktivität in stimulierten und unstimulierten H571- und R571-Zellkulturproben



H571	TLR2-Wildtypkonstrukt
R571	TLR2-Mutantenkonstrukt
+ BLP	Stimulation mit bakteriellem Lipoprotein
p	Signifikanz

Die Abbildung zeigt die unterschiedliche NF- κ B-Aktivierung durch H571 und R571 in relativer Luziferaseaktivität (rLA). Die Aktivierung beider Konstrukte kann durch Stimulation mit BLP signifikant verstärkt werden. Dabei zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Intensität der NF- κ B-Aktivierung zwischen H571 und R571.

3.3.2 Deskriptive Statistik

Tabelle 7: Deskriptive Statistik

Std.abw.	Standardabweichung
Std.fehler	Standardfehler
rLA	Relative Luziferaseaktivität
H571	TLR2-Wildtypkonstrukt
H571 +	TLR2-Wildtypkonstrukt stimuliert mit BLP
R571	TLR2-Mutantenkonstrukt
R571 +	TLR2-Mutantenkonstrukt stimuliert mit BLP

	rLA Total	rLA H571	rLA H571+	rLA R571	rLA R571+
Mittelwert	8,743	8,387	11,706	5,684	9,065
Std.abw.	3,082	2,230	3,145	1,293	1,837
Std.fehler	0,340	0,487	0,686	0,289	0,411
Anzahl	82	21	21	20	20
# fehlend	2	0	0	1	1

4 Diskussion

Toll-like-Rezeptoren nehmen wichtige Funktionen in der Immunabwehr des menschlichen Organismus wahr. Sie sind sowohl für die Erkennung von eingedrungenen Pathogenen als auch für die Induktion antimikrobieller Gene und Kontrolle der adaptiven Immunantwort mitverantwortlich.

4.1 TLR-Mutationen im Mausmodell

Bereits in Modellversuchen mit Knockout-Mäusen konnte die Bedeutung des TLR2 gezeigt werden. Takeuchi et al. zeigten, dass TLR2-defiziente Mäuse nicht auf Peptidoglykane reagieren konnten und zudem nach intravenöser Injektion mit *Staphylococcus aureus* eine signifikant verminderte Überlebensrate aufwiesen als die Wildtypmäuse (43). Diese Anfälligkeit gegenüber grampositiven Bakterien konnten auch Echchannaoui et al. in ihren Versuchen mit Knockout-Mäusen bestätigen. Die TLR2-defizienten Mäuse wiesen eine höhere Morbidität und Mortalität bei einer Pneumokokkenmeningitis im Vergleich zu den Wildtypmäusen auf (10).

In Studien mit Knockout-Mäusen, die tuberkelbakterienhaltiger Luft ausgesetzt wurden, stellten Reiling et al. eine verminderte Resistenz der TLR2-defizienten Mäuse gegenüber hochdosierten Tuberkulosebakterien im Vergleich zum Wildtyp fest (37). TLR2-defiziente Mäuse weisen auch eine defizitäre Immunantwort der Granulozyten in Bezug auf die Auseinandersetzung des Immunsystems mit Tuberkelbakterien auf (9).

Es bestehen aber auch Unterschiede zwischen humanen und animalen Toll-like-Rezeptoren z.B. in der Expression oder Regulation der Toll-like-Rezeptoren, so dass die Ergebnisse der Mausversuche nicht direkt auf den Menschen übertragen werden können (26;33). Dennoch lassen diese Mausversuche den Rückschluss zu, dass Änderungen in der Gensequenz der *Toll-like-Rezeptoren* Auswirkungen auf die Immunabwehr des jeweiligen Organismus haben.

4.2 Funktionelle Relevanz von TLR2-Polymorphismen

In der vorliegenden Arbeit wurden Patientenproben aus Gabun auf Mutationen im *TLR2-Gen* untersucht. Es wurden sechs unterschiedliche Nukleotidpolymorphismen gefunden. Die Varianten G38G, N199N, S450S und L542L sind synonym und scheinen daher keine Relevanz für die Pathogenerkennung zu besitzen. Die Varianten H571R und H579R sind nicht synonym. Polymorphismen sind Genvarianten, die eine Frequenz größer als 1% in einer Population aufweisen. Die hier neu beschriebene Mutation H571R weist eine Allelfrequenz von 5,43% auf und kann somit als polymorphe Variante bezeichnet werden.

Bis auf die Variante H571R sind alle gefundenen Mutationen bereits beschrieben. Daher wurde nur H571R und dessen Auswirkung auf die Funktionalität des TLR2 in dieser Arbeit untersucht. Die Mutation von Histidin zu Arginin (H571R) liegt in der extrazellulären Domäne des Rezeptors. Es konnte gezeigt werden, dass die Variante R571 nach Stimulation mit dem TLR2-Agonisten BLP eine signifikant geringere NF- κ B-Freisetzung bewirkt als der Wildtyp H571. NF- κ B steht am Ende einer intrazellulären Signalkaskade, die schließlich zur Induktion von antimikrobiellen Genen führt und somit die angeborene Immunantwort moduliert.

Bei der Frage nach der Relevanz dieser neu detektierten Variante H571R sollte nicht nur der Austausch der Aminosäure Histidin gegen Arginin betrachtet werden, sondern auch deren Lage innerhalb des Rezeptors. Die Mutation liegt in der extrazellulären Domäne des Rezeptors. Diese ist für die Ligandenerkennung und die Dimerisation mit TLR1 oder TLR6 verantwortlich. Da in diesem Zellkulturversuch nur TLR2 in unterschiedlicher Gensequenz auf der Oberfläche der Zellen exprimiert wurde, kann der Unterschied in der NF- κ B-Induktion nicht mit der Heterodimerbildung von TLR2 mit TLR1 oder TLR6 zusammenhängen. Somit ist die unterschiedliche NF- κ B-Aktivierung am ehesten auf die fehlerhafte Ligandenerkennung oder auf Unterschiede in der Signaltransduktion zurückzuführen.

Mitsuzawa et al. konnten in Deletionsversuchen nachweisen, dass die extrazelluläre Region Ser40-Ile64 für die Erkennung von *Staphylococcus aureus*-Peptidoglykanen wichtig ist (31). Die Erkennung von mykoplasomatischen Lipoproteinen ist ebenfalls an das Vorhandensein dieser Region gekoppelt. Fujita et al. konnten aufgrund von Punktmutationsversuchen einen Zusammenhang zwischen der leuzinreichen Domäne der Aminosäuren 101-124 mit der Erkennung von Peptidoglykanen und deren Induktion von NF- κ B herstellen (12).

Im Bereich der intrazellulären Domäne des TLR2 konnten bereits mehrere Mutationen detektiert werden und es konnte in unabhängigen Studien der Nachweis erbracht werden, dass Polymorphismen zu einer abgeschwächten Zellaktivierung führen. Kang et al. detektierten 2001 eine Mutation des *TLR2*-Gens, die einen Aminosäureaustausch von Arginin zu Tryptophan verursacht (Arg677Trp) und gehäuft bei Patienten mit lepromatöser Lepra auftritt (19). Sie vermuteten, dass Träger dieser Mutation anfälliger sind, an lepromatöser Lepra zu erkranken. In weiteren Studien konnten Kang et al. zeigen, dass Träger der Mutation, die an lepromatöser Lepra erkrankt waren, einen signifikant niedrigeren Serumspiegel von Interleukin-2 und Interleukin-12 sowie Interferon- γ (IFN- γ) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) aufweisen als Probanden, die den TLR2-Wildtyp exprimieren (20). Bochud et al. konnten in vitro nachweisen, dass Zellen, die die Arg677Trp-Mutation tragen, im Vergleich zum Wildtyp auf die Stimulation mit *Mykobakterium leprae* nicht mit einer Induktion von NF- κ B reagierten. Die Mutation im *TLR2* führte somit zu einer verminderten Aktivierung der HEK293-Zellen (8).

In einer Tuberkulosestudie in Tunesien konnte nachgewiesen werden, dass 94% der an Tuberkulose erkrankten Patienten heterozygote Träger der Mutation Arg677Trp waren (7).

Ogus et al. untersuchten in einer retrospektiven Fallkontrollstudie die Allelfrequenzen des Arg753Gln-Polymorphismus (Austausch von Arginin gegen Glutamin) von 151 Tuberkulosepatienten im Vergleich zu 116 gesunden Probanden. In dieser Studie bestand ein Zusammenhang zwischen dem

Auftreten der homozygoten Form der Mutante bei den Probanden und dem Risiko, an Tuberkulose zu erkranken (35).

Malhotra et al. studierten in einer Fallkontrollstudie den Zusammenhang zwischen dem beschriebenen Polymorphismus Arg677Trp und lepromatöser Lepra in einer koreanischen Population. Sie stellten fest, dass die von Kang et al. gefundene Assoziation auf einer Variation des *TLR2*-Gens beruht (25).

Die bereits oben erwähnte Mutation Arg753Gln konnten ebenfalls Lorenz et al. detektieren. Dieser Nukleotidaustausch führt *in vitro* zu einer geringeren Aktivierung der HEK293-Zellen als der Wildtyp. Dies kann wiederum zu einer eingeschränkten Reaktion des Immunsystems auf bakterielle Peptide führen. *In vitro* konnte eine signifikant geringere Reaktion der Mutante auf bakterielle Peptide von *Borrelia burgdorferi* und *Treponema pallidum* nachgewiesen werden (24). Schröder et al. konnten in weiteren Zellkulturversuchen die Unterschiede der Mutante Arg753Gln im Vergleich zum Wildtyp in Bezug auf die TNF- α - und IFN- γ -Induktion nach Stimulation mit *Borrelien*-Lysat untersuchen. Hierbei wurden signifikant niedrigere Serumspiegel beider Zytokine bei den Zellen gefunden, die die Mutante auf der Oberfläche exprimierten (39).

Moore et al. untersuchten die Variante Arg753Gln in einer Fallkontrollstudie, um die Assoziation mit der von Lorenz et al. beschriebenen Anfälligkeit gegenüber Infektionen mit *Staphylococcus aureus* zu überprüfen. In dieser Studie konnte keine Assoziation nachgewiesen werden (32). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch von Aulock et al. durch ihre Studie. Hier konnte festgestellt werden, dass der heterozygote *TLR2*-Polymorphismus keinen Einfluss auf die Zytokinausschüttung als Antwort auf eine Infektion mit *Staphylococcus aureus* ausübt. Für die adäquate Immunantwort ist ein Wildtyp-Allel ausreichend (48).

Schistosomiasis, auch Bilharziose genannt, ist eine durch Trematoden verursachte tropische Parasitose, die vorwiegend in Afrika, Südamerika, dem Nahen Osten und Südwestasien vorkommt.

Da die Proben aus klinischen Untersuchungen von Patienten in Gabun stammen, die an Schistosomiasis erkrankt waren, wurde der Frage nach der

Relevanz der Mutation in Bezug auf die Schistosomiasiserkrankung nachgegangen. Van Der et al. konnten zeigen, dass schistosomale Phosphatidylserine TLR2 aktivieren, und dass diese Aktivierung notwendig ist für die Induktion von Interleukin-10-produzierenden regulatorischen T-Zellen (47). Somit ist der TLR2 als ein für die Erkennung einer Schistosomiasisinfektion wichtiger Rezeptor detektiert worden.

Aufgrund der hier dargestellten Forschungsergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass Träger des Polymorphismus H571R des TLR2 eine erhöhte Morbidität für z.B. die Schistosomiasis aufweisen. Die geringere Induktion von NF- κ B in den R571-Zellen in den Zellkulturversuchen weist auf eine schlechtere Reaktion auf die Stimulation mit einem TLR2-Agonisten hin, die am ehesten auf Defizite in der Ligandenerkennung zurückzuführen ist. Dies führt durch die inadäquate Signaltransduktion und somit unzureichende Geninduktion zu einem Defizit in der Immunabwehr. Die betroffenen Patienten könnten durch die Rezeptormutation nicht in der Lage sein, angemessen auf eingedrungene Pathogene zu reagieren.

In wie weit die Mutation prädisponierend für bestimmte Erkrankungen ist oder zu schwerwiegenderen Krankheitsverläufen führt, sollte in weiterführenden Studien untersucht werden. In einer an diese Arbeit sich anschließenden Studie sollen weitere Proben von Schistosomiasispatienten auf die Mutation H571R untersucht und deren klinische und laborchemische Daten miteinander verglichen werden, um Aufschluss über die klinischen Relevanz zu erhalten.

Da der Polymorphismus in einer niedrigen Frequenz vorhanden ist, müsste aber eine relativ große Population von Individuen untersucht werden, um eine statistisch signifikante Aussage treffen zu können.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der kodierende Bereich des *Toll-like-Rezeptors 2* aus 47 Proben sequenziert und auf Polymorphismen untersucht. Es konnten sechs Polymorphismen im kodierenden Bereich des *TLR2* gefunden werden. Diese liegen in der extrazellulären Domäne des Rezeptors. Vier Polymorphismen (G38G, N119N, S450S, L542L) sind synonym. Zwei Nukleotidpolymorphismen bewirken jeweils einen Aminosäureaustausch von Histidin durch Arginin (H571R, H579R) und sind somit nicht synonym. Die Genotypfrequenzen in dieser Gruppe entsprechen dem Hardy&Weinberg-Modell.

Bei dem Vergleich der Sequenzen mit der Datenbank (Universität Arizona) stellte sich heraus, dass die Varianten G38G, N119N, S450S, L542L und H579R bereits bekannt sind. H571R hingegen ist nicht in der Datenbank gelistet. Diese Variante wird somit erstmalig in dieser Arbeit beschrieben.

Die Variante R571 sowie der Wildtyp H571 des *TLR2* wurden funktionell in einem Plasmid mittels Zellkulturversuch mit HEK293-Zellen untersucht. Als Parameter wurde die NF- κ B-Induzierbarkeit als Luziferaseaktivität gemessen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) in der Induktionsfähigkeit von NF- κ B zwischen dem Wildtyp und der R571-Variante besteht. Nach Stimulation der Rezeptoren mit bakteriellem Lipoprotein konnte eine signifikant geringere NF- κ B-Aktivierung der Zellen, die die Variante exprimierten, gemessen werden ($p < 0,001$).

Die hier neu detektierte und konstruierte Mutation H571R beeinflusst somit die Aktivierbarkeit des *TLR2*, die Induktion von NF- κ B und die Aktivierung des angeborenen Immunsystems.

6 Rohdaten

Tabelle 8: Rohdaten der Luziferase-Assays

Rohdaten der Luziferase-Assays angegeben in relativer Luziferaseaktivität (rLA). Die negativen Werte bei Messungen der Negativkontrollen werden mit 0 gleichgesetzt, da es keine negative Luziferaseaktivität gibt.

Luziferase-Assay 1

	Negativkontrollen			Positivkontrolle	H571			R571		
Basal	0,13	0,07	0,07	5,89	8,36	12,11	12,68	6,72	8,59	7,55
Stimulation mit BLP	0,09	0,09	0,07	6,38	12,75	14,98	16,68	9,99	11,12	12,23

Luziferase-Assay 2

	Negativkontrollen			Positivkontrolle	H571			R571		
Basal	0,11	0,12	0,12	7,43	7,80	7,25	7,57	5,98	5,57	6,13
Stimulation mit BLP	0,14	0,15	0,12	7,46	9,75	10,24	10,20	8,61	8,78	8,63

Luziferase-Assay 3

	Negativkontrollen			Positivkontrolle	H571			R571		
Basal	0,04	0,08		2,50	7,69	9,83		6,04	6,62	
Stimulation mit BLP	0,06	0,07		2,91	11,99	13,94		9,99	10,33	

Luziferase-Assay 4

	Negativkontrollen			Positivkontrolle	H571			R571		
Basal	-0,09	-0,04	0,19	6,81	7,72	7,85	9,31	4,00	3,31	4,78
Stimulation mit BLP	-0,10	-0,07	-0,06	7,13	14,61	14,49	16,51	10,32	11,08	10,86

Luziferase-Assay 5

	Negativkontrollen			Positivkontrolle	H571			R571		
Basal	-0,52	-0,26	-0,56	10,18	5,17	4,56	5,13	4,24	3,94	4,53
Stimulation mit BLP	-0,53	-0,49	-0,43	7,91	6,49	7,03	6,95	6,22	5,82	6,59

Luziferase-Assay 6

	Negativkontrollen			Positivkontrolle	H571			R571		
Basal	0,10	0,09	0,53	8,34	6,68	6,65	7,68	5,58	5,74	6,26
Stimulation mit BLP	0,15	0,14	0,22	7,62	8,19	8,62	9,36	6,89	7,80	10,19

Luziferase-Assay 7

	Negativkontrollen			Positivkontrolle	H571			R571		
Basal	0,08	0,13	0,09	5,24	10,12	10,40	11,08	5,35	6,00	6,76
Stimulation mit BLP	0,17	0,28	0,11	5,13	12,39	14,42	14,44	7,76	7,97	10,30

7 Literaturverzeichnis

1. Akira, S. and Sato, S. Toll-Like Receptors and Their Signaling Mechanisms. *Scand.J.Infect.Dis.* 2003;35(9):555-62.
2. Aliprantis, A. O., Weiss, D. S., and Zychlinsky, A. Toll-Like Receptor-2 Transduces Signals for NF-Kappa B Activation, Apoptosis and Reactive Oxygen Species Production. *J.Endotoxin.Res.* 2001;7(4):287-91.
3. Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Weiss, D. S., Godowski, P., and Zychlinsky, A. The Apoptotic Signaling Pathway Activated by Toll-Like Receptor-2. *EMBO J.* 3-7-2000;19(13):3325-36.
4. Anderson, K. V., Bokla, L., and Nusslein-Volhard, C. Establishment of Dorsal-Ventral Polarity in the Drosophila Embryo: the Induction of Polarity by the Toll Gene Product. *Cell* 1985;42(3):791-8.
5. Arbibe, L., Mira, J. P., Teusch, N., Kline, L., Guha, M., Mackman, N., Godowski, P. J., Ulevitch, R. J., and Knaus, U. G. Toll-Like Receptor 2-Mediated NF-Kappa B Activation Requires a Rac1-Dependent Pathway. *Nat.Immunol.* 2000;1(6):533-40.
6. Belvin, M. P. and Anderson, K. V. A Conserved Signaling Pathway: the Drosophila Toll-Dorsal Pathway. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 1996;12:393-416.
7. Ben Ali, M., Barbouche, M. R., Bousnina, S., Chabbou, A., and Dellagi, K. Toll-Like Receptor 2 Arg677Trp Polymorphism Is Associated With Susceptibility to Tuberculosis in Tunisian Patients. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 2004;11(3):625-6.
8. Bochud, P. Y., Hawn, T. R., and Aderem, A. Cutting Edge: a Toll-Like Receptor 2 Polymorphism That Is Associated With Lepromatous Leprosy Is Unable to Mediate Mycobacterial Signaling. *J.Immunol.* 1-4-2003;170(7):3451-4.
9. Drennan, M. B., Nicolle, D., Quesniaux, V. J., Jacobs, M., Allie, N., Mpagi, J., Fremont, C., Wagner, H., Kirschning, C., and Ryffel, B. Toll-Like Receptor 2-Deficient Mice Succumb to Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Am.J.Pathol.* 2004;164(1):49-57.
10. Echchannaoui, H., Frei, K., Schnell, C., Leib, S. L., Zimmerli, W., and Landmann, R. Toll-Like Receptor 2-Deficient Mice Are Highly Susceptible to Streptococcus Pneumoniae Meningitis Because of Reduced Bacterial Clearing and Enhanced Inflammation. *J.Infect.Dis.* 15-9-2002;186(6):798-806.

11. Frantz, S., Kelly, R. A., and Bourcier, T. Role of TLR-2 in the Activation of Nuclear Factor KappaB by Oxidative Stress in Cardiac Myocytes. *J.Biol.Chem.* 16-2-2001;276(7):5197-203.
12. Fujita, M., Into, T., Yasuda, M., Okusawa, T., Hamahira, S., Kuroki, Y., Eto, A., Nisizawa, T., Morita, M., and Shibata, K. Involvement of Leucine Residues at Positions 107, 112, and 115 in a Leucine-Rich Repeat Motif of Human Toll-Like Receptor 2 in the Recognition of Diacylated Lipoproteins and Lipopeptides and *Staphylococcus Aureus* Peptidoglycans. *J.Immunol.* 1-10-2003;171(7):3675-83.
13. Fukao, T. and Koyasu, S. PI3K and Negative Regulation of TLR Signaling. *Trends Immunol.* 2003;24(7):358-63.
14. Haehnel, V., Schwarzfischer, L., Fenton, M. J., and Rehli, M. Transcriptional Regulation of the Human Toll-Like Receptor 2 Gene in Monocytes and Macrophages. *J.Immunol.* 1-6-2002;168(11):5629-37.
15. Hashimoto, C., Hudson, K. L., and Anderson, K. V. The Toll Gene of *Drosophila*, Required for Dorsal-Ventral Embryonic Polarity, Appears to Encode a Transmembrane Protein. *Cell* 29-1-1988;52(2):269-79.
16. Janeway, C. A., Jr. The Role of Self-Recognition in Receptor Repertoire Development. Members of the Janeway Laboratory. *Immunol.Res.* 1999;19(2-3):107-18.
17. Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. Innate Immune Recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 2002;20:197-216.
18. Jones, B. W., Heldwein, K. A., Means, T. K., Saukkonen, J. J., and Fenton, M. J. Differential Roles of Toll-Like Receptors in the Elicitation of Proinflammatory Responses by Macrophages. *Ann.Rheum.Dis.* 2001;60 Suppl 3:iii6-12.
19. Kang, T. J. and Chae, G. T. Detection of Toll-Like Receptor 2 (TLR2) Mutation in the Lepromatous Leprosy Patients. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 2001;31(1):53-8.
20. Kang, T. J., Yeum, C. E., Kim, B. C., You, E. Y., and Chae, G. T. Differential Production of Interleukin-10 and Interleukin-12 in Mononuclear Cells From Leprosy Patients With a Toll-Like Receptor 2 Mutation. *Immunology* 2004;112(4):674-80.
21. Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin. *Immunity.* 1999;11(1):115-22.

22. Kirschning, C. J. and Schumann, R. R. TLR2: Cellular Sensor for Microbial and Endogenous Molecular Patterns. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2002;270:121-44.
23. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette Spatzle/Toll/Cactus Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* 20-9-1996;86(6):973-83.
24. Lorenz, E., Mira, J. P., Cornish, K. L., Arbour, N. C., and Schwartz, D. A. A Novel Polymorphism in the Toll-Like Receptor 2 Gene and Its Potential Association With Staphylococcal Infection. *Infect.Immun.* 2000;68(11):6398-401.
25. Malhotra, D., Relhan, V., Reddy, B. S., and Bamezai, R. TLR2 Arg677Trp Polymorphism in Leprosy: Revisited. *Hum.Genet.* 2005;116(5):413-5.
26. Matsuguchi, T., Takagi, K., Musikacharoen, T., and Yoshikai, Y. Gene Expressions of Lipopolysaccharide Receptors, Toll-Like Receptors 2 and 4, Are Differently Regulated in Mouse T Lymphocytes. *Blood* 15-2-2000;95(4):1378-85.
27. Medzhitov, R. Toll-Like Receptors and Innate Immunity. *Nature* 2001;1:135-45.
28. Medzhitov, R. and Janeway, C., Jr. Innate Immune Recognition: Mechanisms and Pathways. *Immunol.Rev.* 2000;173:89-97.
29. Medzhitov, R. and Janeway, C. A., Jr. How Does the Immune System Distinguish Self From Nonself? *Semin.Immunol.* 2000;12(3):185-8.
30. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. A Human Homologue of the *Drosophila* Toll Protein Signals Activation of Adaptive Immunity. *Nature* 24-7-1997;388(6640):394-7.
31. Mitsuzawa, H., Wada, I., Sano, H., Iwaki, D., Murakami, S., Himi, T., Matsushima, N., and Kuroki, Y. Extracellular Toll-Like Receptor 2 Region Containing Ser40-Ile64 but Not Cys30-Ser39 Is Critical for the Recognition of *Staphylococcus Aureus* Peptidoglycan. *J.Biol.Chem.* 2-11-2001;276(44):41350-6.
32. Moore, C. E., Segal, S., Berendt, A. R., Hill, A. V., and Day, N. P. Lack of Association Between Toll-Like Receptor 2 Polymorphisms and Susceptibility to Severe Disease Caused by *Staphylococcus Aureus*. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 2004;11(6):1194-7.

33. Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P., and Mantovani, A. Differential Expression and Regulation of Toll-Like Receptors (TLR) in Human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells. *J.Immunol.* 1-6-2000;164(11):5998-6004.
34. O'Neill, L. A. and Dinarello, C. A. The IL-1 Receptor/Toll-Like Receptor Superfamily: Crucial Receptors for Inflammation and Host Defense. *Immunol.Today* 2000;21(5):206-9.
35. Ogus, A. C., Yoldas, B., Ozdemir, T., Uguz, A., Olcen, S., Keser, I., Coskun, M., Cilli, A., and Yegin, O. The Arg753Gln Polymorphism of the Human Toll-Like Receptor 2 Gene in Tuberculosis Disease. *Eur.Respir.J.* 2004;23(2):219-23.
36. Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., and Aderem, A. 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* 5-12-2000;97(25):13766-71.
37. Reiling, N., Holscher, C., Fehrenbach, A., Kroger, S., Kirschning, C. J., Goyert, S., and Ehlers, S. Cutting Edge: Toll-Like Receptor (TLR)2- and TLR4-Mediated Pathogen Recognition in Resistance to Airborne Infection With Mycobacterium Tuberculosis. *J.Immunol.* 1-10-2002;169(7):3480-4.
38. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. DNA Sequencing With Chain-Terminating Inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1977;74(12):5463-7.
39. Schroder, N. W., Diterich, I., Zinke, A., Eckert, J., Draing, C., von, Baehr, V, Hassler, D., Priem, S., Hahn, K., Michelsen, K. S., Hartung, T., Burmester, G. R., Gobel, U. B., Hermann, C., and Schumann, R. R. Heterozygous Arg753Gln Polymorphism of Human TLR-2 Impairs Immune Activation by *Borrelia burgdorferi* and Protects From Late Stage Lyme Disease. *J.Immunol.* 15-8-2005;175(4):2534-40.
40. Takeda, K. and Akira, S. Microbial Recognition by Toll-Like Receptors. *J.Dermatol.Sci.* 2004;34(2):73-82.
41. Takeda, K. and Akira, S. Microbial Recognition by Toll-Like Receptors. *J.Dermatol.Sci.* 2004;34(2):73-82.
42. Takeda, K. and Akira, S. TLR Signaling Pathways. *Semin.Immunol.* 2004;16(1):3-9.

43. Takeuchi, O., Hoshino, K., and Akira, S. Cutting Edge: TLR2-Deficient and MyD88-Deficient Mice Are Highly Susceptible to Staphylococcus Aureus Infection. *J.Immunol.* 15-11-2000;165(10):5392-6.
44. Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., Da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C. J., Hacker, H., and Wagner, H. Endocytosed HSP60s Use Toll-Like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 to Activate the Toll/Interleukin-1 Receptor Signaling Pathway in Innate Immune Cells. *J.Biol.Chem.* 17-8-2001;276(33):31332-9.
45. Vabulas, R. M., Braedel, S., Hilf, N., Singh-Jasuja, H., Herter, S., Ahmad-Nejad, P., Kirschning, C. J., Da Costa, C., Rammensee, H. G., Wagner, H., and Schild, H. The Endoplasmic Reticulum-Resident Heat Shock Protein Gp96 Activates Dendritic Cells Via the Toll-Like Receptor 2/4 Pathway. *J.Biol.Chem.* 7-6-2002;277(23):20847-53.
46. Van Den Biggelaar, A. H., van Ree, R., Rodrigues, L. C., Lell, B., Deelder, A. M., Kremsner, P. G., and Yazdanbakhsh, M. Decreased Atopy in Children Infected With Schistosoma Haematobium: a Role for Parasite-Induced Interleukin-10. *Lancet.* 18-11-2000;356(9243):1723-7.
47. Van Der, Kleij D., Latz, E., Brouwers, J. F., Kruize, Y. C., Schmitz, M., Kurt-Jones, E. A., Espevik, T., de Jong, E. C., Kapsenberg, M. L., Golenbock, D. T., Tielens, A. G., and Yazdanbakhsh, M. A Novel Host-Parasite Lipid Cross-Talk. Schistosomal Lyso-Phosphatidylserine Activates Toll-Like Receptor 2 and Affects Immune Polarization. *J.Biol.Chem.* 13-12-2002;277(50):48122-9.
48. von Aulock, S., Schroder, N. W., Traub, S., Gueinzius, K., Lorenz, E., Hartung, T., Schumann, R. R., and Hermann, C. Heterozygous Toll-Like Receptor 2 Polymorphism Does Not Affect Lipoteichoic Acid-Induced Chemokine and Inflammatory Responses. *Infect.Immun.* 2004;72(3):1828-31.
49. Yamamoto, M. and Akira, S. [TIR Domain--Containing Adaptors Regulate TLR-Mediated Signaling Pathways]. *Nippon Rinsho* 2004;62(12):2197-203.
50. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S. Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. *Science* 1-8-2003;301(5633):640-3.
51. Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R. R., Tuomanen, E., Dziarski, R., and Golenbock, D. Cutting Edge: Recognition of Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components by the Innate Immune System Occurs Via Toll-Like Receptor 2. *J.Immunol.* 1-7-1999;163(1):1-5.

8 Danksagung

Ich danke

Jesus

Erich und Margarethe Weinkötz

Felix Wolff

Prof. Dr. P.G. Kremsner

Prof. Dr. Dr. h. c. N. Blin

PD. Dr. J. Kun

Dr. Benjamin Mordmüller

Dr. Angelica Boldt

Andrea Weierich

Silvelia Gummes

Rolf Fendel

9 Lebenslauf

Jutta Wolff, geb. Weinkötz, geboren am 26.07.1978 in Flensburg

Bildungsgang

1985 – 1989	Besuch der Grundschule in Kieholm
1989 – 1998	Besuch des Gymnasiums Klaus-Harms in Kappeln
Juni 1998	Abitur am Klaus-Harms Gymnasium
Aug.1998– Feb.1999	Arbeit im Gesundheitsprojekt in Tansania
SS 1999	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Philipps-Universität in Marburg
März 2001	Ärztliche Vorprüfung
März 2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2002	Wechsel des Studienortes an die Eberhard-Karls- Universität Tübingen
SS 2003	Forschungssemester: Durchführung des Experimentellen Teils der Dissertationsarbeit in der AG PD Dr. Jürgen Kun, Institut für Tropenmedizin
SS 2004	Beginn der Anfertigung des schriftlichen Teils der Dissertationsarbeit
14.04. -03.07.04	Auslandsaufenthalt in Ecuador
März 2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
25.04.05–28.02.06	Praktisches Jahr im Kreiskrankenhaus Albstadt
11.05.06	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 01.09.06	Assistenzärztin in der Allgemeinchirurgie in Wismar