

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Mikrobiologie

Funktion der Dual-Specificity-Phosphatase-5 in Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems

Julia Steudle

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Schemann

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Liebl
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 20.12.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 28.03.2012 angenommen.

Minds are like parachutes, they only function when they're open.

Thomas Robert Dewar (1864-1930)

1	Einleitung	1
1.1	Die Rezeptor vermittelte angeborene Immunantwort	1
1.1.1	Die Pathogenerkennung erfolgt mittels Mustererkennungs-Rezeptoren	1
1.1.2	Aktivierte <i>Toll-like</i> Rezeptoren rekrutieren Adaptermoleküle, welche Kinasen aktivieren.....	2
1.1.3	Der <i>Toll-like</i> Rezeptor-Signalweg wird durch inhibitorische Proteine reguliert	5
1.2	Die Regulation der Immunantwort durch <i>Dual-specificity</i> -Phosphatasen (DUSPs).....	7
1.2.1	DUSPs gehören zur Familie der Protein-Tyrosin-Phosphatasen	7
1.2.1.1	DUSPs dephosphorylieren MAPK.....	8
1.2.1.2	DUSPs sind nukleär und/oder zytoplasmatisch lokalisiert	8
1.2.1.3	DUSPs weisen Funktionen auf, die sich in der Domänenstruktur widerspiegeln	9
1.2.2	DUSPs sind Regulatoren der MAPK-vermittelten Immunantwort.....	10
1.2.2.1	DUSP1 und DUSP10 sind negative Regulatoren der Immunantwort.....	11
1.2.2.2	DUSP4 und DUSP2 sind positive Regulatoren der Immunantwort.....	13
1.2.2.3	Der ERK1/2-spezifische Signalweg interagiert mit diversen DUSPs.....	14
1.2.2.4	Die Lokalisation von ERK1/2 entscheidet über die MAPK-Aktivität.....	14
1.2.2.5	DUSP5 ist ERK-spezifisch.....	15
2	Fragestellung	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Material.....	18
3.1.1	Chemikalien	18
3.1.2	Verbrauchsmaterial	20
3.1.3	Geräte und technisches Zubehör	21
3.1.4	Enzyme.....	22
3.1.5	Stammlösungen und Puffer	22
3.1.6	Antikörper und -seren.....	26
3.1.6.1	Erstantikörper für Western Blots.....	26
3.1.6.2	Zweitantikörper für Western Blots.....	26
3.1.6.3	FACS-Antikörper	27
3.1.7	Oligonukleotide.....	28
3.1.8	Reagenzienkits	30

3.1.9 Medien.....	31
3.1.9.1 Nährmedien für Bakterienkulturen.....	31
3.1.9.2 Nährmedien für Zellkulturen.....	31
3.1.10 Bakterien und Zelllinien.....	34
3.1.11 Versuchstiere.....	35
3.1.12 Klonierungsvektoren/Plasmide.....	35
3.2 Methoden.....	37
3.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	37
3.2.1.1 Isolierung von RNA aus Mauszellen.....	37
3.2.1.2 Isolierung von RNA aus Zelllinien.....	37
3.2.1.3 Reverse Transkription zur cDNA-Synthese.....	37
3.2.1.4 Isolierung genomischer DNA aus Gewebe oder Zellen.....	38
3.2.1.4.1 Aufreinigung von Mausschwanz DNA.....	38
3.2.1.4.2 Isolierung genomischer DNA aus Zellen.....	38
3.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> -Stämmen.....	39
3.2.1.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (allgemein).....	39
3.2.1.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (rein).....	39
3.2.1.5.3 Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab (rein).....	39
3.2.1.5.4 Plasmid-DNA-Isolierung für Transfektionsexperimente.....	40
3.2.1.6 Amplifikation von DNA durch die Polymerase Kettenreaktion.....	40
3.2.1.7 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	42
3.2.1.8 Restriktionsspaltungen.....	43
3.2.1.8.1 Sequenzierungen.....	44
3.2.2 Mikrobiologische Methoden.....	44
3.2.2.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien.....	44
3.2.2.2 Ligation.....	44
3.2.2.2.1 Ligation mit der T4-DNA-Ligase.....	44
3.2.2.2.2 Ligation mit dem TOPO TA Cloning® Kit.....	45
3.2.2.3 Dephosphorylierung eines Vektors.....	45
3.2.2.4 Klonierung von PCR-Produkten in einen Vektor.....	46
3.2.2.4.1 Aufreinigung von PCR Produkten.....	46
3.2.2.4.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	46
3.2.2.5 Transformation von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	46

3.2.2.5.1	Herstellung von kompetenten <i>E.coli</i> -Zellen.....	47
3.2.2.5.2	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	47
3.2.2.5.3	Transformation eines TOPO-TA-Ligationsansatzes.....	47
3.2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	48
3.2.2.7	Southern Blot.....	48
3.2.2.7.1	Verdau der genomischen DNA	48
3.2.2.7.2	Auftrennung der DNA mittels Agarosegelelektrophorese	49
3.2.2.7.3	Aufbau einer Southern Blots	49
3.2.2.7.4	Herstellung ³² P-markierter DNA-Sonden	50
3.2.2.7.5	Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren.....	50
3.2.3	Zellbiologische Methoden.....	51
3.2.3.1	Zellkultur.....	51
3.2.3.1.1	Zellen auftauen	51
3.2.3.1.2	Zellen einfrieren	51
3.2.3.1.3	Kultivierung embryonaler Mausstammzellen	51
3.2.3.1.4	Generierung rekombinanter ES-Zellklone	53
3.2.3.1.5	Generierung chimärer Mäuse	55
3.2.3.1.6	Transfektion von Hek293 Zellen mittels Calcium-Phosphat.....	56
3.2.3.1.7	Transfektion von Hek293 Zellen mittels Fugene [®] HD Transfection Reagent.....	56
3.2.3.1.8	jetPEI [™] Transfektion	57
3.2.3.1.9	Makrophagentransfektion mittels jetPEI [™] -Macrophage	58
3.2.3.1.10	Makrophagentransfektion mittels Elektroporation.....	58
3.2.3.1.11	Herstellung einer stabilen Makrophagenzelllinie.....	58
3.2.3.1.12	Verschiedene Stimulationsansätze für Makrophagen	59
3.2.4	Immunologischen Methoden.....	60
3.2.4.1	Western Blot (Immunoblot)	60
3.2.4.2	FACS-Analyse	61
3.2.4.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels ELISA	61
3.2.4.3.1	Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in Zellüberständen	62
3.2.4.3.2	Bestimmung von Serum-Immunglobulinkonzentrationen.....	62
3.2.5	Proteinbiochemische Methoden	62
3.2.5.1	Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen (RIPA-Lyse).....	62

3.2.5.2	Luciferaseassay	63
3.2.5.3	SDS-PAGE.....	63
3.2.6	Tierexperimentelle Methoden	65
3.2.6.1	Organentnahme bei Mäusen.....	65
3.2.6.1.1	Gewinnung von Zellen aus Milz und Thymus.....	65
3.2.6.1.2	Isolierung von Knochenmarkszellen.....	65
3.2.6.1.3	Generierung von Knochenmarks-Makrophagen	65
3.2.6.2	Thioglykollat-Injektion und Peritoneallavage.....	66
3.2.6.3	Erythrozytenlyse.....	66
3.2.6.4	Serumgewinnung.....	66
3.2.6.5	Untersuchung im Sepsismodell.....	66
3.3	Statistische Auswertungsverfahren	67
4	Ergebnisse	68
4.1	Die Expression der Phosphatase DUSP5 in Immunzellen	68
4.1.1	Die Expression von DUSP5 in Immunzellen kann induziert werden	68
4.1.2	TLR2-Stimulation und CGRP induzieren den DUSP5-Promoter.....	69
4.1.3	DUSP5 reguliert die Zytokinproduktion nach TLR2-Stimulation.....	70
4.1.3.1	DUSP5-überexprimierende Makrophagen zeigen nach TLR-Stimulation eine erhöhte Zytokinproduktion.....	70
4.1.3.2	Die erhöhte Zytokinproduktion ist unabhängig von der ERK-Phosphorylierung	72
4.1.3.3	Die erhöhte Zytokinproduktion erfolgt ohne Beteiligung der Phosphataseaktivität.....	73
4.1.3.4	Die erhöhte Zytokinproduktion ist abhängig von der NLS-Domäne.....	73
4.2	Generierung eines DUSP5-Knockout Mausstammes.....	75
4.2.1	Schritt 1: Klonierung eines DUSP5-Inaktivierungsvektors	75
4.2.2	Schritt 2: Generierung homolog rekombinierter ES-Zellen.....	78
4.2.3	Schritt 3: Generierung eines DUSP5 ^{-/-} Mausstammes aus rekombinanten ES-Zellen.....	80
4.3	Phänotypische Charakterisierung der DUSP5-Knockout Maus.....	84
4.3.1	Immunologische Charakterisierung der DUSP5-Knockout Maus.....	84
4.3.1.1	DUSP5-Knockout Makrophagen zeigen nach TLR2-Stimulation keine veränderte Zytokinproduktion.....	84

4.3.2	Einfluss von DUSP5 auf die B- oder T-Zellentwicklung	87
4.3.3	Die Konzentration der Serum-Immunglobuline in DUSP5-Knockout Mäusen ist unverändert	90
5	Diskussion	91
5.1	<i>In vitro</i> Analyse der physiologischen Funktion von DUSP5	91
5.1.1	Die DUSP5 vermittelte Regulation des TLR-Signalweges.....	91
5.1.2	Die DUSP5-Expression in Immunzellen.....	93
5.2	Generierung und Charakterisierung einer DUSP5-Knockout Maus	99
5.2.1	Generierung einer konditionalen DUSP5-Knockout Maus.....	99
5.2.2	Charakterisierung der DUSP5-Knockout Maus.....	100
5.2.2.1	Makroskopische und zelluläre Charakterisierung von nicht aktivierten DUSP5-Knockout-Mäusen.....	100
5.2.2.2	Zelluläre Charakterisierung von aktivierten DUSP5-Knockout Zellen	103
5.3	Ausblick.....	103
6	Zusammenfassung.....	105
7	Summary.....	106
8	Literaturverzeichnis.....	107
9	Anhang	118
9.1	Abkürzungsverzeichnis	118
9.2	Abbildungsverzeichnis	124
9.3	Tabellenverzeichnis.....	125
9.4	Vektorkarten.....	126
	Danksagung	128
	Lebenslauf.....	129

1 Einleitung

1.1 Die Rezeptor vermittelte angeborene Immunantwort

1.1.1 Die Pathogenerkennung erfolgt mittels Mustererkennungs-Rezeptoren

Der Organismus tritt über äußere und innere Epitheloberflächen in ständige Interaktion mit Mikroorganismen. Da viele Bakterien für den Körper lebenswichtig sind, muss der Organismus im Allgemeinen und das Immunsystem im Speziellen, zwischen nützlichen und pathogenen Mikroorganismen unterscheiden, Pathogene bekämpfen und dadurch den Organismus vor Infektionen durch Bakterien und Viren, aber auch Pilzen und Parasiten schützen. Um diese Aufgabe zu bewältigen werden unterschiedliche Erkennungssysteme und ein breites Spektrum an Effektormechanismen benötigt. Diese sind Teil der angeborenen Immunantwort und führen zu einer unmittelbaren Immunreaktion. Ist diese Reaktion nicht ausreichend verfügt der Organismus mit der adaptiven Immunantwort über eine zweite Verteidigungsebene. Es wird jedoch angenommen, dass für die Bekämpfung von 99% aller Infektionen die angeborene Immunantwort alleine verantwortlich ist (1).

Da Pathogene sowohl extra- als auch intrazellulär auftreten können, gibt es auf beiden Ebenen mehrere unterschiedliche Abwehrmechanismen. Diese beruhen auf dem Prinzip von Mustererkennungsrezeptoren, den sogenannten PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), die evolutionär pathogen-spezifische, hochkonservierte Strukturen, sogenannte PAMPs (*Pathogen-associated Molecular Patterns*) erkennen und über Aktivierung intrazellulärer Signalwege die Genexpression von Immunzellen beeinflussen (2) (3) (4). Die PRRs können dabei löslich, intrazellulär oder membrangebunden vorliegen.

Lösliche Rezeptoren binden extrazelluläre PAMPs und markieren bzw. opsonisieren die Pathogene dadurch für die unspezifische Beseitigung durch phagozytierende Immunzellen. An diesem Prozess sind das Komplement, ein System von Plasmaproteinen, das an den Oberflächen der Mikroorganismen eine Kaskade von proteolytischen Reaktionen auslöst sowie einige Akute-Phase-Proteine (wie z.B. Mannose-bindendes Lektin, Lipopolysaccharid (LPS)-bindendes Protein) beteiligt (2).

Zu Vertretern der intrazellulären PRRs gehören die NLRs (*NOD-like Receptors*) und die RLHs (*RIG-like Helicases*). Diese lösen in unterschiedlichsten Gefährdungssituationen eine Immunantwort aus. So erkennen NLRs einerseits bakterielle PAMPs (wie z.B.

Peptidoglykanstrukturen, RNA, Flagellin, Lipopolysaccharid, bakterielle Toxine) (5) (6); andererseits aber auch DNA-/RNA-Viren und sogar endogene Gefahrensignale wie z.B. extrazelluläres ATP (7) (8). Die Ligandenbindung löst die Aktivierung der Immunzellen durch Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*) und dem IL1 (Interleukin-1) aktivierenden Enzym Caspase-1 hervor. RLHs werden dagegen durch Bindung viraler *ss*- oder *ds*-RNA aktiviert. Dies führt ebenfalls zur Aktivierung von NF- κ B sowie zur Bildung von TypI-IFN (TypI-Interferon). Da es sich sowohl bei den NLRs als auch bei den RLHs um zytosolische Rezeptoren handelt, wird vermutet, dass diese hauptsächlich für die Bekämpfung bereits ins Zytosol eingedrungener Pathogene verantwortlich sind und somit nicht an der wichtigen Verteidigungsebene, der Erkennung und Bekämpfung extrazellulärer Pathogene beteiligt sind.

Bei den membrangebundenen Rezeptoren können die endozytischen und die Signal-gebenden Rezeptoren unterschieden werden. Die endozytischen Rezeptoren (C-typ Lektin-ähnlichen Membranrezeptoren, *Scavenger*-Rezeptoren) sind auf Phagozyten exprimiert und vermitteln die Aufnahme und den Transport zu den Lysosomen; nach lysosomalem Abbau und Antigenprozessierung werden die mikrobiellen Peptide T-Zellen über MHC (*Major Histocompatibility Complex*)-Klasse-II-Moleküle (Teil der erworbenen Immunität) präsentiert (9). Eine wichtige Gruppe membranständiger PRRs stellen die Signal-gebenden TLR (*Toll-like Receptors*) dar. Dabei handelt es sich um Mustererkennungsrezeptoren, die pathogene Strukturen primär auf der Zelloberfläche, aber auch endosomal erkennen.

1.1.2 Aktivierte *Toll-like* Rezeptoren rekrutieren Adaptermoleküle, welche Kinasen aktivieren

Insgesamt besitzen Säuger zur Erkennung aller Mikroorganismen zwölf unterschiedliche TLR, welche entweder extrazellulär auf der Zellmembran oder intrazellulär auf der Endosomenmembran exprimiert werden. Die Aktivierung der TLR erfolgt nach spezifischer Rezeptor-Ligandenbindung der PAMPs und wird über TLR-spezifische Adapterproteine weitergeleitet. Abhängig davon, welche Adapterproteine die jeweiligen TLR für ihren Signalweg verwenden, wird zwischen dem MyD88- (*Myeloid Differentiation Factor 88*) abhängigen und dem TRIF- (*TIR Domain-containing Adapter Protein inducing IFN- β*) abhängigen TLR-Signalweg (Abbildung1) unterschieden (10).

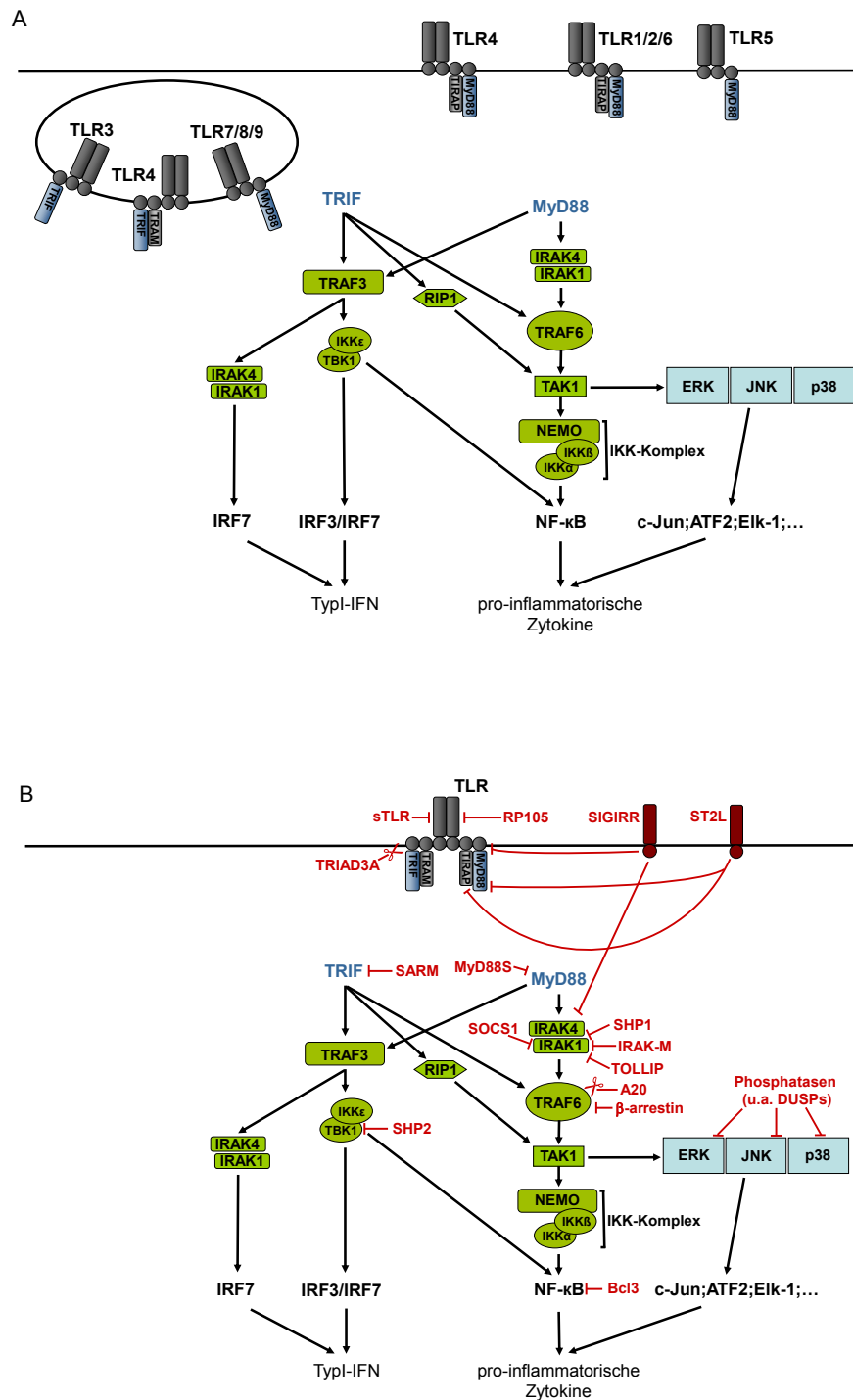


Abbildung 1: Übersicht über die Signalwege der TLR und deren Inhibitoren. A) Es sind zwölf verschiedenen Typen von TLR bekannt, die entweder aus Homo- oder aus Heterodimeren bestehen. Dieses Repertoire ermöglicht die Erkennung beinahe jedes Pathogens. Beim nachfolgenden Signalweg wird zwischen dem MyD88-abhängigen und dem TRIF-abhängigen Signalweg unterschieden. Beim MyD88-abhängigen Signalweg werden je nach TLR verschiedene Adaptermoleküle (MyD88, TIRAP, TRAM) rekrutiert. Die nachfolgende Signalkaskade mündet in der Aktivierung von NF-κB, welches die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine induziert. Beim TRIF-abhängigen Signalweg wird die Signalkaskade durch das Adaptermolekül TRIF vermittelt. Auch dieser Signalweg mündet in der Aktivierung von NF-κB, kann alternativ aber auch die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 aktivieren und damit die Produktion von TypI-IFN induzieren. B) An der Regulation des TLR-Signalweges sind viele unterschiedliche Inhibitoren beteiligt. Einige dieser Inhibitoren und deren Zielproteine sind dargestellt.

Beim MyD88-abhängigen Signalweg werden je nach Typ des TLR verschiedene TIR- (*Toll/IL-1 Receptor Homology*) Domänen enthaltende Adaptermoleküle (MyD88, TIRAP [*TIR Domain-containing Adaptor Protein*], TRAM [*TRIF-related Adaptor Molecule*]) rekrutiert. Dies führt über eine Kaskade von Proteinen der IRAK (*IL-1R Associated Kinases*)-Familie, über TRAF6 (*TNF Receptor Associated Factor 6*) und TAK1 (*Transforming Growth Factor β -activated Kinase 1*) zu Aktivierung des IKK (*I κ B Kinases*)-Komplexes, welcher schließlich NF- κ B aktiviert. Alternativ zum IKK-Komplex kann TAK1 aber auch MAPKs (*Mitogen-activated Protein Kinases*) aktivieren. In beiden Fällen mündet der Signalweg in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine induzieren (10). Für plasmazytoide Dendritische Zellen konnte nach TLR7 und TLR9 Aktivierung gezeigt werden, dass MyD88 über IRAK4 und IRAK1 den Transkriptionsfaktor *Interferon-regulatory Factor 7* (IRF7) aktiviert und damit die Produktion von TypI-IFN induziert (11).

Beim TRIF-abhängigen Signalweg interagiert das ebenfalls eine TIR-Domäne enthaltende Adaptermolekül TRIF mit RIP1 (*Receptor Interacting Protein 1*) und TRAF6, welches wie beim MyD88-abhängigen Signalweg, entweder über den IKK-Komplex zur Aktivierung von NF- κ B oder über die Aktivierung von MAPKs zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine führt. TRIF kann zusätzlich aber auch mit TRAF3 interagieren, woraufhin TBK1/IKKi (*TANK Binding Kinase 1 / Inducible I kappa-B Kinase*) aktiviert wird, welche die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 aktivieren, welche die Produktion von TypI-IFN induzieren (10).

Sowohl beim MyD88-abhängigen als auch beim TRIF-abhängigen Signalweg werden somit zentrale Schritte von MAPKs vermittelt. Die Aktivierung der MAPKs erfolgt bei beiden Signalwegen abhängig von TRAF6. Die aktiven MAPKs phosphorylieren latente Transkriptionsfaktoren (wie c-Jun, Elk-1 und ATF2 [*Activating Transcription Factor 2*]), die eine schnelle transkriptionelle TLR-Antwort vermitteln (12).

Bei den MAPK handelt es sich um Serin/Threonin-Proteinkinasen. Dabei wird bei Säugern innerhalb der Familie der MAPK zwischen den klassischen MAPK (ERK1/2 [*Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2*], p38 [*p38 Mitogen-activated Protein Kinase*], JNK [*c-Jun N-terminal Kinase*] und ERK5) und den atypischen MAPKs (ERK3/4, NLK [*NEMO-like Kinase*] und ERK7) unterschieden. Über die Regulation und Funktion der atypischen MAPK und ERK5 ist jedoch wenig bekannt (13). Die Aktivierung der MAPK p38, ERK1/2 und JNK

erfolgt durch Phosphorylierung eines Threonin- und eines Tyrosin-Restes. Nach Aktivierung können diese ihrerseits eine große Anzahl unterschiedlicher Zielstrukturen wie z.B. Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren mittels Phosphorylierung aktivieren. Daneben können sie die Genexpression ihrer Zielproteine aber auch verändern, indem sie deren Transport oder Translation beeinflussen, oder deren mRNA-Stabilität verändern, indem sie z.B. inflammatorische Zytokin-mRNA mittels *Adenosine-Uridine-rich elements* (AREs) stabilisieren (14) (15).

1.1.3 Der *Toll-like* Rezeptor-Signalweg wird durch inhibitorische Proteine reguliert

Der TLR-Signalweg schützt den Organismus vor Pathogenen, indem er die angeborene Immunantwort auslöst und die adaptive Immunantwort induziert (16) (17). Bei Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungs- und Infektionskrankheiten konnte jedoch ebenfalls eine Beteiligung der TLRs festgestellt werden (18). Dies zeigt, wie wichtig die Balance zwischen Aktivierung und Inhibierung des TLR-Signalweges ist und setzt eine strenge Regulation voraus. Dies wird dadurch erreicht, dass der TLR-Signalweg auf jeder Stufe der Signalkaskade, oftmals von mehreren Proteinen reguliert wird (Abbildung 1).

Extrazellulär können während einer akuten bakteriellen Infektion lösliche TLR (*soluble decoy* TLRs [sTLRs]) (19) wie z.B. sTLR2 und sTLR4 in Blut und Gewebe den TLR-Signalweg negativ regulieren, indem sie die PAMPs abfangen. Außerdem gibt es Transmembranproteinregulatoren wie z.B. ST2L (20) und SIGIRR (21), die ebenfalls inhibitorisch auf den TLR-Signalweg einwirken. Ebenso hemmend kann die Ubiquitin-Ligase TRIAD3A wirken, indem sie durch Ubiquitinylierung bestimmter TLR deren proteasomalen Abbau einleitet. Es gibt aber auch TLR-homologe-Proteine ohne Funktion innerhalb der TLR-Signalkaskade, wie z.B. RP105 (22), die eine Initiation der TLR-Signalkaskade durch Abfangen der TLR-Effektoren verhindern.

Hat die Rezeptor-Ligandenbindung bereits stattgefunden, gibt es zahlreiche intrazelluläre Regulatoren (u.a. MyD88s, IRAKM, SOCS1, NOD2, PI3K, TOLLIP, A20, β -Arrestin, SHP1, SHP2, SARM) die den TLR-Signalweg inhibieren (23). Manche diese Regulatoren werden konstitutiv exprimiert während andere durch den TLR-Signalweg induziert werden.

Diese negativen Regulatoren greifen auf unterschiedlichen Ebenen der TLR-Signalkaskade ein, wie z.B. Hemmung der Autoubiquitinylierung bzw. Abspaltung von Ubiquitinyl-Resten,

Inhibierung durch Antagonisten, Inhibierung des Signalweges durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung und Regulation der Transkription. So verhindert z.B. β -Arrestin die für die Aufrechterhaltung der weiteren Signalkaskade essentielle Autoubiquitinylierung von TRAF6 (24), während A20 (Deubiquitinylierungsprotein) die Signalkaskade inhibiert, indem es den Ubiquitinyl-Rest von TRAF6 abspaltet (25). Bei MyD88s handelt es sich um einen löslichen MyD88-Antagonisten, und IRF4 (26) agiert inhibierend, indem es um die IRF5-Bindung an MyD88 konkurriert. Die Bindung von IRAKM an IRAK1 inhibiert dessen Phosphorylierung, indem es die IRAK1/IRAK4-Dissoziation vom TLR/MyD88-Komplex verhindert (27). Wie bei vielen Signalkaskaden mit Kinasen-Beteiligung sind selbstverständlich auch Phosphatasen (z.B. SHP1, SHP2) an der negativen Regulation des TLR-Signalweges beteiligt (28) (29). Eine besondere Stellung im Signalweg nehmen MAPK ein, deren schnelle und reversible Aktivierung und Deaktivierung essentiell für die Regulation und Interaktion zentraler Signalwege der Immunantwort ist. Hierbei werden die mittels Phosphorylierung von Tyrosin- und Threonin-Resten aktivierten MAPK gegenreguliert, indem sie wiederum von Phosphatasen dephosphoryliert werden. Diese Phosphatasen umfassen Tyrosin-, Serin/Threonin- und zweifach-spezifische MAPK-Phosphatasen (*dual-specificity* Phosphatasen [DUSPs] oder auch MAPK-spezifische Phosphatasen [MPKs] genannt). Auch auf der Transkriptionsebene kann die Signalkaskade reguliert werden. So konnte z.B. in einer Studie von Carmody *et al.* gezeigt werden, dass der transkriptionelle Co-Aktivatoren Bcl3 die Bindung der transkriptionell inaktiven NF- κ B-Untereinheit p50 an die DNA stabilisiert und dadurch die über den TLR-Signalweg induzierte Gentranskription verhindert (30). TLR-induzierte Transkriptionswege werden jedoch auch anderweitig beeinflusst. So führt das Neuropeptid CGRP (*Calcitonin gene-related peptide*) via eines cAMP-abhängigen Signalweges zu einer verminderten TLR-induzierten TNF α (*tumor necrosis factor- α*)-Transkription (31).

Zusätzlich zu den o.g. Regulationsmechanismen sorgt der TLR-induzierte Zelltod (Apoptose) dafür, dass hyper-aktivierte Zellen eliminiert werden (23).

1.2 Die Regulation der Immunantwort durch *Dual-specificity*-Phosphatasen (DUSPs)

1.2.1 DUSPs gehören zur Familie der Protein-Tyrosin-Phosphatasen

Die Superfamilie der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) (Abbildung 2) umfasst beim Menschen 107 Gene, wobei insgesamt mehr als die Hälfte dieser PTPs in Immunzellen exprimiert werden. Als gemeinsames Strukturmerkmal findet sich bei allen PTPs in ihrem aktiven Zentrum ein kanonisches C(X)₅R Motiv. Basierend auf strukturellen Homologien und ihrer Substrat-Spezifität werden die PTPs in vier Kategorien (Typ-I bis Typ-III Cystein-abhängige PTPs und Aspartat-abhängige PTPs) unterteilt (32). Die Typ-I PTPs beinhalten neben den klassischen PTPs auch die zweifach-spezifischen (*dual-specificity*)-Phosphatasen (DUSPs), die sich dadurch auszeichnen, die Hydrolyse von zwei Phosphatbindungen eines Substratproteins auf einmal zu katalysieren.

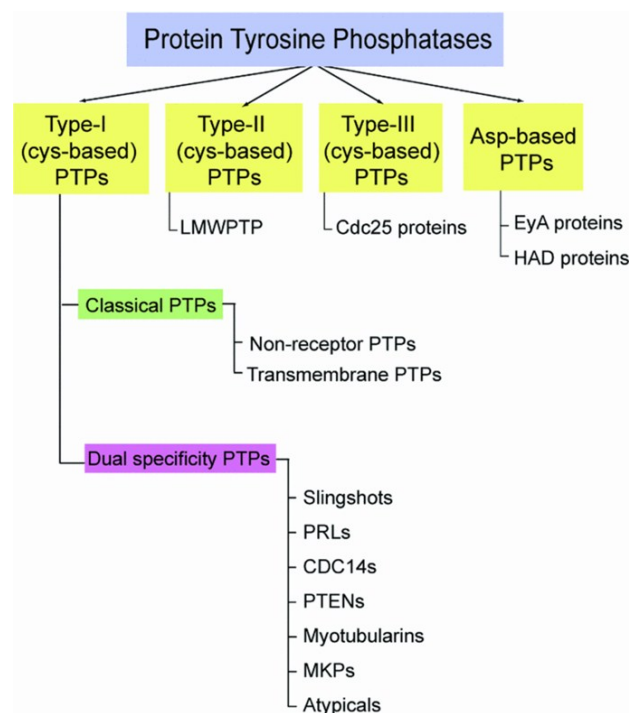


Abbildung 2: Die Einteilung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Basierend auf Sequenzhomologien und funktionalen Domänen lassen sich die Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) in vier Untergruppen einteilen: Typ-I PTPs beinhalten die klassischen PTPs und die *dual-specificity* PTPs (DUSPs), die Gruppe der Typ-II PTPs besteht aus nur einer *low-molecular-mass* PTP (LMWPTP), die Typ-III PTPs beinhalten drei Zellzyklusregulatoren (CDC25A, CDC25B und CDC25C) und die vierte Gruppe besteht aus Aspartat-basierten PTPs und beinhaltet die EyA (*eyes absent*) Tyrosin-spezifischen Phosphatasen und die Familie der HAD- (*haloacid dehalogenase*) Phosphatasen. Die große und heterogene Gruppe der Typ-I PTPs umfasst 61 DUSPs, die aufgrund spezifischer Domänen und Sequenzhomologie in weitere Untergruppen eingeteilt werden: *slingshot-like* PTPs, PRL (*Phosphatase of regenerating liver*), CDC14-Phosphatasen, PTEN-like PTPs, Myotubularin PTP, MKPs (*mitogen-activated protein kinase phosphatase*) und atypische DUSPs. Patterson *et al.* (32)

Die DUSPs werden aufgrund von Sequenzhomologien und vorhandener spezifischer Domänen in weitere Untergruppen unterteilt. Eine der am besten untersuchten Untergruppe stellen dabei die MKPs (*Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatases*) oder MAPK-spezifischen DUSPs dar. Sie besitzen ein Threonin-x-Tyrosin (TxY)-Motiv und wirken zweifach-spezifisch an MAPK, indem sie je einen Tyrosin- und Threonin-Rest dephosphorylieren (33) (34) (35) (36). Weitere Untergruppen der DUSPs sind: *Slingshot-like* PTPs, PRL (*Phosphatase of Regenerating Liver*), CDC14 (*Cell Division Cycle 14*)-Phosphatasen, *PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue)-like* PTPs, Myotubularin PTP und atypische DUSPs.

1.2.1.1 DUSPs dephosphorylieren MAPK

Insgesamt ergab die Analyse des humanen und murinen Genoms, dass 30 der o.g. DUSP-Familienmitglieder aktivierte MAPKs dephosphorylieren können, sich aber hinsichtlich Gewebeverteilung, subzellulärer Lokalisation, transkriptioneller Regulation, Aktivierungsbedingungen und MAPK-Spezifität unterscheiden (33) (37). Beim Menschen sind zehn verschiedene Gene der MAPK-spezifischen DUSPs bekannt. Diese können die aktivierenden Phospho-Threonin- und Phospho-Tyrosin-Reste von ERK1/2 und/oder anderer MAPKs (JNK, p38) dephosphorylieren und damit in direkter Opposition zu aktivierenden Signalen von vorgeschalteten (*upstream*) Kinasen agieren (38) (39). Die Funktion dieser MAPK-spezifischen DUSPs ist evolutiv konserviert (33) (40).

1.2.1.2 DUSPs sind nukleär und/oder zytoplasmatisch lokalisiert

Aufgrund ihrer subzellulären Lokalisation und Substrat-Spezifität werden die MAPK-spezifischen DUSPs in drei weitere Untergruppen eingeteilt: induzierbare Zellkern-lokalisierte (nukleäre) MAPK-spezifische DUSPs, zytoplasmatisch ERK-spezifische DUSPs und atypische MAPK-spezifische DUSPs.

Die *dual specificity*-Phosphatasen DUSP1, DUSP2, DUSP4, DUSP5 sind MAPK-deaktivierende, nur nukleär induzierbare DUSPs. Sie dephosphorylieren ERK1/2 und mit Ausnahme von DUSP5 auch JNK und/oder p38 (41) (42) (43). DUSP5 katalysiert spezifisch nur die Dephosphorylierung von ERK1/2.

Im Gegensatz dazu sind die *dual specificity*-Phosphatasen DUSP6, DUSP7, DUSP9 nicht auf den Zellkern beschränkt und werden, da sie bevorzugt ERK1/2 dephosphorylieren, als zytoplasmatische ERK MKPs bezeichnet (44) (45) (46). DUSP8, DUSP10, DUSP16 zeigen

gegenüber JNK und/oder p38 eine größere Aktivität und werden als JNK/p38 MKPs (47) (48) (40) bezeichnet.

Eine weitere Untergruppe, die atypischen DUSPs sind kleiner, haben keine offensichtliche MAPK-Interaktionssequenz [s. Abschnitt 1.2.1.3] und dephosphorylieren diverse Substrate (49) (50). Jedoch können auch Mitglieder dieser Gruppe direkt an MAPK wirken. So dephosphoryliert DUSP3 ERK1/2 (51) (52) während DUSP18 und DUSP22 JNK oder dessen Aktivatoren dephosphoryliert (53) (54) (55).

1.2.1.3 DUSPs weisen Funktionen auf, die sich in der Domänenstruktur widerspiegeln

Strukturell weisen alle MAPK-spezifischen DUSPs zwei gemeinsame Merkmale auf (Abbildung 3). Sie besitzen alle eine am C-Terminus lokalisierte hoch konservierte katalytische Domäne. Diese Phosphatasedomäne ist für die Katalyse der Dephosphorylierung sowohl des Tyrosin- als auch des Threonin-Restes innerhalb des MAPK (TxY)-Aktivierungsmotives verantwortlich. Eine Sequenzhomologie zu der VH-1 Protein-Tyrosin-Phosphatase, die aus dem Vaccinia Virus isoliert wurde, konnte gezeigt werden (56). Außerdem befindet sich am N-Terminus aller MAPK-spezifischen DUSPs eine variable Region, welche über spezifische Sequenzen, sogenannte KIMs (Kinase-Interaktions-Motive) mit der MAPK interagiert. Diese Region besitzt ein Cluster positiv geladener Aminosäuren (57) und bestimmt, ob DUSPs nach der Dephosphorylierung mit MAPK assoziiert bleiben (57) (58) (41) (59). Da die korrespondierende D-(*Docking*)-Domäne der MAPK aus negativ geladenen Aminosäureresten besteht wird angenommen, dass die Abfolge der positiv geladenen Aminosäurereste eine Rolle bei der Festlegung der Bindungsspezifität und der damit einhergehenden katalytischen Aktivität spielt (48). Dies legt nahe, dass elektrostatische Interaktionen entscheidend für eine Bindung sind (48). Flankiert wird diese Region von zwei CDC25-homologen (CH2-) Domänen. Diese zeigen Sequenzhomologie zu der Phosphatase CDC25, welche an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist (60) (61), über deren funktionale Bedeutung jedoch wenig bekannt ist. Es wird jedoch angenommen, dass sie kritische KIMs enthalten, welche eine MAPK-Substratspezifität gewährleisten.

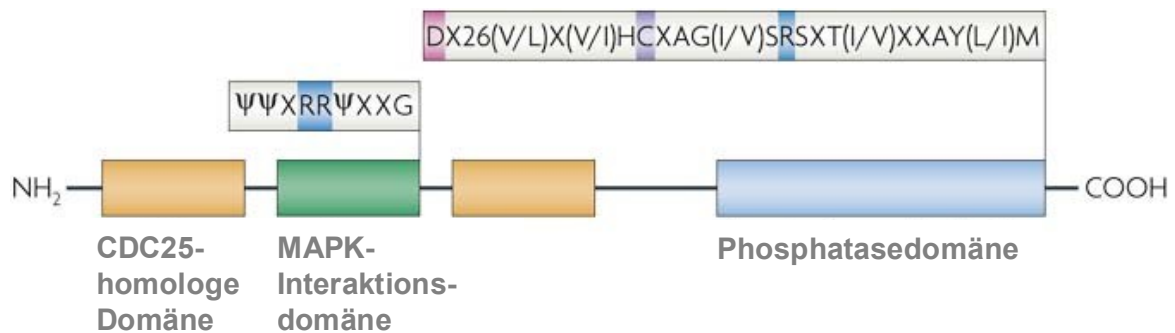


Abbildung 3: Gemeinsame strukturelle Merkmale der MAPK-spezifischen DUSPs. Am C-Terminus ist eine hoch konservierte katalytische Domäne (Phosphatasedomäne) lokalisiert. Essentiell für die Katalyse sind die drei markierten Aminosäurereste (D/C/R) im katalytischen Zentrum. Der nukleophile Angriff erfolgt über das Thiolat-Anion des Cystein-Restes an dem Phosphor-Rest des Substrates und führt zur Bildung eines Thiol-Phosphat-Intermediates (=Übergang des Phosphat-Restes auf die Phosphatase). Der Aspartat-Rest der Phosphatase protoniert in dieser Phase das Alkoholat-Anion des Tyrosin- bzw. Threonin-Restes im Zielprotein, welches somit dephosphoryliert vorliegt. Der intermediär phosphorylierte Cystein-Rest der Phosphatase wird anschließend mit einem Molekül Wasser dephosphoryliert und somit für den nächsten Reaktionszyklus regeneriert. Hierbei ermöglicht u.a. der konservierte Arginin-Rest über seine Imin-Gruppe eine Stabilisierung der Übergangszustände. Am N-Terminus existiert eine MAPK-Interaktionsdomäne mit der Konsensussequenz $\Psi\Psi XRR\Psi XXG$ (Ψ steht für eine hydrophobe Aminosäure, X für eine beliebige Aminosäure), wobei die zwei kationischen Arginin-Reste entscheidend für die elektrostatische MAPK-Interaktion sind. Flankiert wird diese Region von zwei CDC25-homologen (CH2-) Domänen, von denen angenommen wird, dass auch sie eine Rolle bei der MAPK-Interaktion spielen. Liu *et al.* (62)

Je nachdem, wo die MAPK-spezifischen DUSPs lokalisiert sind, können diese unterschiedliche zelluläre Lokalisierungssequenzen besitzen. Dabei handelt es sich um eine aus wenigen Aminosäuren bestehende Signalsequenz, die Phosphatasen tragen, wenn sie in den Zellkern eingeschleust (NLS) bzw. aus dem Zellkern ausgeschleust (NES) werden sollen. Die Sequenz besteht bei der NES (*Nuclear Export Signal*) aus vier hydrophoben Aminosäuren (63), bei der NLS (*Nuclear Localization Signal*) aus zumeist positiv geladenen Aminosäuren wie Lysin und Arginin (64).

1.2.2 DUSPs sind Regulatoren der MAPK-vermittelten Immunantwort

Pathogene Mikroorganismen werden von TLR auf Makrophagen erkannt, die daraufhin die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und Mediatoren induzieren. Da eine überschießende Produktion jedoch zur Hyperinflammation führt, muss die Makrophagenaktivierung streng kontrolliert werden. Um zu untersuchen, ob an dieser Regulation Phosphatasen beteiligt sind, wurde mithilfe von Mikroarrays die Expression verschiedener Phosphatasen in ruhenden und TLR4-aktivierten Makrophagen betrachtet. Dabei konnte eine Beteiligung unterschiedlicher DUSPs an der Regulation des TLR4-vermittelten Signalweges nachgewiesen werden, so sind nach TLR4-Stimulation mehrere DUSPs (DUSP1, DUSP2, DUSP16) hoch reguliert (65).

Neben der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine ist die Aktivierung Antigen spezifischer T-Zellen eine wichtige Funktion des angeborenen Immunsystems. T-Zellen, die eine zentrale Rolle sowohl in der Initiierung als auch der Aufrechterhaltung von Immunantworten einnehmen, exprimieren DUSPs. Während ihrer Differenzierung im Thymus durchlaufen die Zellen drei Hauptstadien: DN (doppeltnegativ, d.h. die Zellen exprimieren weder CD4 noch CD8), DP (doppeltpositiv für CD4 und CD8) und SP (single-positive, entweder CD4 oder CD8). Dabei wird sowohl die positive als auch die negative Selektion, die im SP-Stadium stattfindet, über denselben T-Zell-Rezeptor vermittelt. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass aktives ERK für eine erfolgreiche T-Zellentwicklung benötigt wird (66) (67) (68) (69) (70). So ist die positive Selektion mit einer niedrigen, anhaltenden ERK-Aktivierung assoziiert, während negativ selektierende Liganden eine starke kurzzeitige ERK-Aktivität induzieren (71) (70). Die Betrachtung der DUSP Expressionsmuster in verschiedenen T-Zell-Subpopulationen des murinen Thymus zeigt, dass sechs der insgesamt im Thymus exprimierten zehn DUSPs (DUSP1, DUSP2, DUSP4, DUSP5, DUSP6, DUSP7, DUSP10, DUSP11, DUSP12, DUSP19) ERK dephosphorylieren (72). Des Weiteren können im Thymus fünf der sechs ERK-spezifischen Phosphatasen mittels T-Zell-Rezeptor Aktivierung induziert werden (72). Während der T-Zellentwicklung kann ein signifikanter Anstieg der Expression verschiedener DUSPs (DUSP1, DUSP4, DUSP5) beobachtet werden. Somit könnten DUSPs als Antwort auf T-Zell-Rezeptor Signale die ERK-Aktivität in T-Zellen regulieren.

1.2.2.1 DUSP1 und DUSP10 sind negative Regulatoren der Immunantwort

DUSP1 (MKP1) wird durch den TLR-Signalweg induziert und ist für die negative Regulation von p38 verantwortlich (Abbildung 4). Eine stabile, anhaltende DUSP1-Expression ist dabei jedoch von der Anwesenheit anti-inflammatorisch wirkender Substanzen (IL10, Dexamethason) abhängig, führt dann aber zur Inhibierung der Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL12 (65), IL6 (65) und TNF α (73). Bei der Betrachtung der Substrat-Spezifität von DUSP1 in Makrophagen, der Hauptquelle der Zytokinproduktion, konnte ausschließlich eine schnelle p38-Deaktivierung beobachtet werden, obwohl DUSP1 *in vitro* auch ERK1/2 (74) (42), bevorzugt jedoch p38 und JNK (75) (53) dephosphoryliert. Da bekannt ist, dass IL10 an der Makrophagendeaktivierung beteiligt ist, weisen diese Daten auf DUSP1 als IL10-induzierten potentiellen Mediator, der durch eine schnelle p38-Deaktivierung zur Makrophagendeaktivierung führt. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Tiere mit DUSP1-Deletion sensitiver gegenüber einem durch Lipopolysaccharid (LPS)

TLR4-induzierten endotoxischen Schock sind. Dieser führt zu einer abnormalen Koagulation, schweren Hypotension, vaskulärem Schock und multiplen Organversagen (von Nieren, Leber und Lunge) in dessen Folge die Sterblichkeit der Tiere merklich erhöht ist (76). Dieses komplexe klinische Syndrom der Sepsis resultiert aus einer schädlichen oder zerstörenden Wirtsantwort gegen eine mikrobielle Infektion aufgrund einer dysregulierten Immunantwort, ausgelöst durch eine übermäßige Produktion pro-inflammatorischer Zytokine ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$) (77) (78). Die Untersuchung dieser Parameter zeigte, dass der DUSP1-Verlust tatsächlich das Muster der Zytokinproduktion in LPS-stimulierten Zellen der angeborenen Immunantwort verändert. So steigert die DUSP1-Deletion die Biosynthese sowohl der pro-inflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und IL6 als auch des anti-inflammatorischen Zytokines IL10 nach LPS-Stimulation *in vivo* dramatisch (76). Außerdem führt die DUSP1-Deletion zu verminderter LPS-induzierter IL12 -Produktion (76), einem klassischen von Makrophagen produziertem $\text{T}_\text{H}1$ -Zytokin, welches die Differenzierung von naiven T_H -Zellen in $\text{T}_\text{H}1$ -Zellen fördert (79). Betrachtet man den Phosphorylierungszustand der DUSP1-Substrate, so zeigen DUSP1 deletierte Zellen nach LPS-Stimulation eine verlängerte p38- und JNK-Aktivierung (76).

DUSP10 (MKP5) wird während der angeborenen Immunantwort induziert und ist an der negativen Regulation des JNK-Signalweges beteiligt (80) (Abbildung 4). Der Verlust der Phosphatase führt zu einem starken Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine (IL6 , $\text{TNF}\alpha$) (80). Untersuchungen zeigten außerdem, dass DUSP10 für die T-Zellproliferation wichtig ist und der DUSP10-Knockout in Mäusen zu einem verbesserten Verlauf der Autoimmunkrankheit EAE (*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*) beiträgt (80). Außerdem ist DUSP10 an der negativen Regulation der Funktion von Effektor CD4- und CD8-T-Zellen beteiligt, welche wahrscheinlich den Wirtsorganismus vor Schäden durch exzessive T-Zellantworten schützen (80).

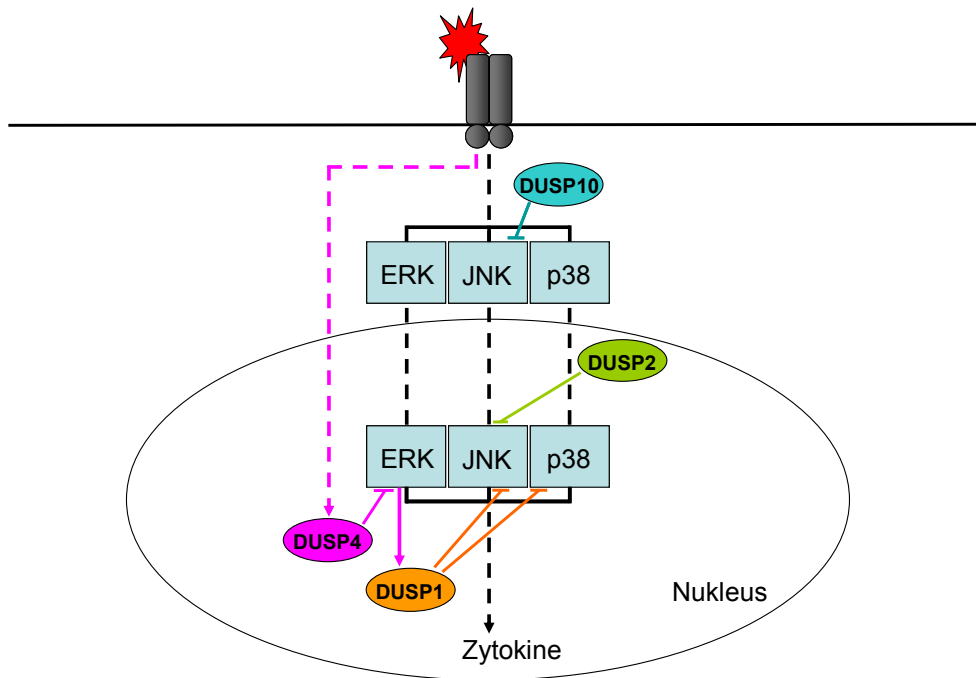


Abbildung 4: Die Rolle von DUSPs beim TLR-Signal auf dem Weg in den Zellkern (*in vivo*). Schematisch vereinfachte Darstellung der Lokalisation und der Substrate der MAPK-spezifischen DUSPs. Bei allen gezeigten DUSPs konnte im Mausmodell eine immunregulatorische Wirkung nachgewiesen werden. DUSP1 ist für die negative Regulation von p38 und JNK verantwortlich. Diese resultiert in einer verminderten Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL12, IL6 und TNF α , aber auch des anti-inflammatorischen Zytokines IL10. Außerdem wird mehr IL12 (fördert T_H1-Zelldifferenzierung) produziert. DUSP10 ist an der negativen Regulation des JNK-Signalweges beteiligt und führt zu einer verminderten Menge der pro-inflammatorischen Zytokine IL6 und TNF α . DUSP4 wird über den TLR-Signalweg induziert und führt zu einer Dephosphorylierung von ERK, aber auch zu einer verminderten DUSP1-Expression. Dies resultiert in einem Anstieg der pro-inflammatorischen (TNF α , IL1 β , IL6) und anti-inflammatorischen (IL10) Zytokine, sowie einer verminderten Hemmung von p38 über DUSP1. DUSP2 ist für die Inhibierung von JNK verantwortlich, resultiert jedoch trotzdem in der Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine (IL6, IL1 β , TNF α). Ein JNK-ERK *crossstalk* wird vermutet.

1.2.2.2 DUSP4 und DUSP2 sind positive Regulatoren der Immunantwort

Bei einer induzierten Sepsis lassen sich im Serum von DUSP4-Knockout Mäusen reduzierte Mengen pro-inflammatorischer (TNF α , IL1 β , IL6) und anti-inflammatorischer (IL10) Zytokine messen. Damit einhergehend haben diese Tiere eine größere Überlebenschance. In Makrophagen zeigen sie eine verstärkte ERK-Phosphorylierung, und eine verminderte JNK- und p38-Phosphorylierung, aber interessanterweise nach LPS-Stimulation auch eine verstärkte DUSP1-Expression (81). Wurde zusätzlich ein DUSP1-Knockdown durchgeführt, zeigten Zellen eine erhöhte Zytokinproduktion (81). Diese Ergebnisse lassen auf einen Mechanismus schließen, bei dem DUSP4 durch ERK-Deaktivierung die DUSP1-Expression inhibiert und damit den negative Wirkung von DUSP1 auf die Zytokinproduktion verhindert (Abbildung 4).

DUSP2-Knockout Mäuse zeigen im Arthritismodell (K/BxN *model of rheumatoid arthritis*) eine stark reduzierte Entzündungsantwort und damit einhergehend stark verminderte Mengen pro-inflammatorischer Zytokine (IL6, IL1 β , TNF α) und Chemokine. Der Verlust der Phosphatase führt in Immunzellen (Makrophagen, Mastzellen) zu einer verstärkten JNK-Aktivität und einer verminderten Aktivität von ERK und p38 (Abbildung 4). Durch JNK-Inhibierung lässt sich die ERK-Aktivität wieder herstellen. Daher kann man auf DUSP2 als einen positiven Regulator des Entzündungsantwort, vermittelt durch JNK und ERK *crossstalk* schliessen (82).

1.2.2.3 Der ERK1/2-spezifische Signalweg interagiert mit diversen DUSPs

Eine Vielzahl unterschiedlicher DUSPs beeinflussen den ERK1/2-Signalweg. Dabei ist eine Prognose über eine DUSP vermittelte ERK1/2 Regulation schwierig, da DUSPs unterschiedliche MAPK-Substrate dephosphorylieren können (38) (39), ihre Transkription schnell und in einer Stimulus-spezifischen Weise reguliert wird und ihre Expression zelltypspezifisch ist (59) (82) (38) (39) (59). Trotzdem konnte gezeigt werden, dass mindestens zwölf DUSPs ERK1/2 *in vitro* dephosphorylieren (38) (39) und damit den ERK1/2 Signalweg beeinflussen (59). Für ERK2 konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von verschiedenen DUSPs nicht redundant reguliert wird (59).

1.2.2.4 Die Lokalisation von ERK1/2 entscheidet über die MAPK-Aktivität

Neben dem Phosphorylierungszustand ist auch die Lokalisation von ERK1/2 entscheidend für dessen MAPK-Aktivität. Die MAPK-spezifischen DUSPs haben neben dem Deaktivierungspotential durch Dephosphorylierung auch die Fähigkeit, ERK1/2 über eine DUSP-ERK1/2-Komplexbildung an der Translokation zu hindern und somit eine Aktivität von ERK1/2 im Zellkern ebenfalls zu inhibieren. Normalerweise löst die Aktivierung von ERK1/2 dessen Translokation in den Zellkern aus, wo es als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Zielgene veranlasst.

Wie in Abschnitt 1.2.1.2 beschrieben, wird zwischen den nukleär lokalisierten, induzierbaren DUSPs und den zytoplasmatisch vorliegenden DUSPs unterschieden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung und Translokation von ERK2 zur Synthese der nukleär induzierbaren DUSPs (DUSP1, DUSP2, DUSP4, DUSP5) führt, die sowohl die Dephosphorylierung als auch, mit Ausnahme von DUSP1, durch Assoziation mit ERK2 die Verankerung von ERK2 im Zellkern vermitteln (59). Im Gegensatz dazu inaktiviert DUSP1

zwar ERK2, assoziiert jedoch nicht und ERK2 kann somit zurück ins Zytosol translozieren (41) (59) wo es wieder aktiviert werden kann. Phosphatasen, die einen DUSP-ERK2-Komplex bilden inhibieren die ERK2-abhängige Transkription indem sie die Menge an aktivem ERK2 im Zellkern reduzieren. Werden alle vier Mitglieder der nukleär induzierbaren DUSPs zeitgleich deletiert steigt sowohl die Menge an aktivem nukleären ERK2 als auch die von aktivem ERK2-abhängige Transkription stark an (59). Bei den zytoplasmatischen DUSPs führt die ERK2 Inaktivierung und/oder die zelluläre Lokalisation zum Rückgang der ERK2-abhängigen Transkription.

Während diese DUSPs einen negativ regulatorischen Effekt auf ERK2 ausüben, existieren auch DUSPs (DUSP10, DUSP16) die, indem sie JNK/p38 inaktivieren den von diesen MAPK vermittelten negativ regulatorischen *crossstalk* mit ERK2 inhibieren (83) und dadurch ERK2 positiv regulieren (59). Diese Phosphatasen unterstützen die ERK2 abhängige Transkription, indem sie die Menge an aktiviertem ERK2 in der gesamten Zelle erhöhen.

1.2.2.5 DUSP5 ist ERK-spezifisch

In einer Studie von Kwak und Dixon wurde die dual spezifische VH-1 ähnliche PTPase hVH-3 (*human VH-1 like clone 3*, 384bp, Chromosomenzuordnung 10q25), oder kurz DUSP5, als eine von Wachstumsfaktoren und Stresssignalen induzierte Phosphatase charakterisiert. Die Expression der primär im Zellkern lokalisierten Phosphatase (84) erfolgt dabei kurze Zeit (DUSP5 ist ein *immediate early* Gen) nachdem ein extrazellulärer Stimulus gesetzt wurde. Die von ERK1/2 vermittelte Induktion erfolgt Kinase-Interaktions-Motiv (KIM) abhängig innerhalb der C-terminalen Domäne von DUSP5, durch Phosphorylierung (T321, S346, S376) (85). Die Stabilität oder Lokalisation von DUSP5 wird durch die Phosphorylierung nicht beeinflusst, jedoch wird das sehr kurzlebige Protein (Halbwertszeit liegt bei ca. 45 Minuten) durch die ERK-Assoziation stabilisiert (85) und könnte dadurch die Funktion von DUSP5 sowohl als ERK-spezifische Phosphatase als auch als nukleäres Ankerprotein von ERK unterstützen. Eine Aktivität von DUSP5 als MAPK-spezifische DUSP konnte gezeigt werden, da ERK1 sowohl an einem Tyrosin- als auch am benachbarten Threonin-Rest dephosphoryliert wird (84). Das katalytisch aktive Zentrum ist dabei in Exon 4 der vier DUSP5-Exons kodiert.

Eine Beteiligung von DUSP5 an der Regulation der Immunantwort konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden. Es gibt Hinweise, dass sowohl in T-Zellen als auch in B-Zellen wichtige Funktionen von DUSP5 vermittelt werden. DUSP5 zeigt eine

Empfindlichkeit gegenüber T-Zell-Rezeptor Signalen (CD3-Stimulation), die innerhalb von 30 Minuten zu einem 43-fachen Anstieg der DUSP5 Transkription in Thymozyten führt (72) und weist auf eine Beteiligung von DUSP5 bei der Thymozyten-Selektion hin. Weitere Studien zeigten eine schnelle, kurzzeitige DUSP5-Aktivierung in Lymphozyten. Die Zytokinstimulation (IL2, IL7, IL15) reifer T-Zellen erhöht die DUSP5-mRNA Expression innerhalb von 30 Minuten, eine erhöhte DUSP5 Protein Expression ist für zwei Stunden nachweisbar (86). Die DUSP5 Induktion vermindert dabei die IL2-induzierte ERK-Aktivierung, indem es als negativer *Feedback* von ERK dient. Des Weiteren wurde eine DUSP5-Aktivierung in einem Modell für die negative Selektion von selbstreaktiven B-Zellen beobachtet. Die Stimulation (IgM) einer B-Zelllinie führte innerhalb von vier Stunden zu einer signifikanten Erhöhung der DUSP5-mRNA (87).

Damit ist DUSP5 ein zentraler Faktor für die Regulation von Immunantworten und greift vermutlich auch in den TLR-Signalweg regulatorisch ein. Die Mechanismen der DUSP5-vermittelten Regulation sind jedoch unbekannt.

2 Fragestellung

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte in unserem Labor in Genaktivierungstudien gezeigt werden, dass in TLR2 (Pam₃Cys) aktivierten Dendritischen Zellen die Expression von DUSP5 induziert wird. Die Induzierbarkeit von DUSP5 und die Tatsache, dass DUSP5 in fast allen Immunzellen eine mittlere bis starke Expression aufweist, lässt eine Funktion von DUSP5 in der Signaltransduktion von TLR und damit bei der Immunantwort vermuten. Um diese Funktion genauer zu untersuchen sollte eine DUSP5 überexprimierende Makrophagenzelllinie generiert werden, mit deren Hilfe die Auswirkung einer verstärkten DUSP5-Expression auf die TLR-vermittelte Zytokinproduktion untersucht werden sollte. Die Generierung weiterer DUSP5-Funktionsmutanten sollte in diesem Zusammenhang die Untersuchung des Mechanismus der DUSP5 vermittelten ERK1/2-Deaktivierung ermöglichen. Zusätzlich sollte durch Promoterassays die Induzierbarkeit des DUSP5-Promoters untersucht werden.

Da bei *in vitro* Experimenten nur einzelne Aspekte der komplexen Zusammenhänge der Immunantwort untersucht werden können, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine konditionale DUSP5-Knockout Maus generiert werden. Durch das bei diesem Tiermodell verwendete Cre/loxP-Rekombinationssystem kann DUSP5 sowohl ubiquitär als auch spezifisch in einzelnen Geweben deletiert werden. Damit ermöglicht dieses Modell die Untersuchung der Funktion von DUSP5 bei der Immunantwort *in vivo*.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Bio-Rad, München
Agar	Difco, Kansas, USA
Agarose	Invitrogen, Leek, NL; FCM, Rockford, USA
GP Agarose (Genetic Pure)	Biozym, Oldendorf
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich, Stammheim
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Stammheim
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Stammheim
Biotase	Biochrom, Berlin
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Stammheim
CGRP (Calcitonin-gene Related Peptide)	Sigma-Aldrich, Stammheim
D(+)-Glukose	Sigma-Aldrich, Stammheim
Desoxyribonukleotide	Fermentas, St. Leon-Rot
Diethylether	Fischar, Saarbrücken
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Stammheim
ECL Reagenz	Pierce, Bonn
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
GeneRuler™ 100 bp DNA Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1 kb DNA Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Difco, Kansas, USA
Hybridisierungspuffer	Sigma-Aldrich, Stammheim

IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Sigma-Aldrich, Stammheim
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Isopropanol	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Lachssperma-DNA	Invitrogen, Leek, NL
Lipopolysaccharid (<i>Escherichia coli</i>)	Sigma-Aldrich, Stammheim
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Stammheim
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Bio-Rad, München
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, Stammheim
BES (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-Ethylaminsulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natrium-Deoxycholat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Stammheim
NP-40 (Igepal)	MP Biomedicals, Eschwege
Orange G	Sigma-Aldrich, Stammheim
PageRuler TM Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Bonn
Pam ₃ Cys	EMC microcollections, Tübingen
Pefablock	Roche, Mannheim
PepstatinA	Sigma-Aldrich, Stammheim
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (1:1:1)	Sigma-Aldrich, Stammheim
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, Stammheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Stammheim
Protease Inhibitor Cocktail Mini	Roche, Mannheim

Proteinase K	Sigma-Aldrich, Stammheim
ReBlot™ Plus Mild	Chemicon, Hampshire, UK
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich, Stammheim
RNase	Roche, Mannheim
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Stammheim
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt; Sigma-Aldrich, Stammheim
SYBR® Green PCR Master Mix	ABI, Foster City, USA
TEMED (Tetramethylenethyldiamin)	Bio-Rad, München
Tris Base	Roth, Karlsruhe
Türksche Lösung	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-indolyl-galactopyranoside)	Fermentas, St. Leon-Rot

Radiochemikalien

[α ³² P]-dCTP	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig Spezifische Aktivität: ~3.000 Ci/mmol T _{1/2} : 14,3 d Die Radiochemikalie wurde immer innerhalb der ersten Halbwertszeit eingesetzt.
--------------------------	---

3.1.2 Verbrauchsmaterial

3MM Whatman Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Hyperfilm (Röntgenfilme)	Amersham, Braunschweig
MicroSpin™ S-200HR Säulchen	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Parafilm M	American National Can™, Chicago, USA
Plastikwaren	Falcon, Heidelberg

	Nunc, Naperville, USA
	Corning, New York, USA
	Eppendorf, Hamburg
	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen	Braun, Melsungen
Sterilfilter	BD Falcon, Bedford, USA

3.1.3 Geräte und technisches Zubehör

7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Binokular	Zeiss, Jena
Brutschränke	Heraeus, Hanau
CL-1000 UV Crosslinker	UVP, Upland, USA
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Fisher Scientific, Ulm
Elektrophoresekammer für Polyacrylamidgele	Biometra, Göttingen
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad, München
Mikrotiterplatten Washer	Tecan, Grödig, Österreich
Gel Doc XR System	Bio-Rad, München
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
	Kleinfeld, Gehrden
Inkubator Innova 4230	New Brunswick Scientific, Edison, USA
MasterCycler epgradient S	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	Zeiss, Jena
Mithras LB940	Berthold, Bad Wildbad
NanoDrop [®] ND-1000	Nanodrop Techn., Wilmington, USA
Neubauer-Zählkammern	Brandt, Berlin
pH-Meter	Inolab pH Level 1, WTW, Weilheim
Phosphoimager Storm 840	Molecular Dynamics, Krefeld
Phosphoscreen, -kassette (35x43 cm)	Amersham, Braunschweig
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach

Proteintransfer Transblot SD (semi-dry)	Bio-Rad, München
Rediprime II Random Primed Labeling System	GE Healthcare Europe GmbH, München
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn; Purelab ultra, ELGA, Berkefeld
Rotationsrad Mixing Rotor	Renner, Darmstadt
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Spannungsversorgung Power Pack P25	Biometra, Göttingen
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Typon Optimax X-Ray Film Processor	Protec GmbH & CoKG, Oberstenfeld
Vortexer	Scientific Industries, New York, USA
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	Memmert, Schwabach; Julabo, Seelbach
Zentrifugen	Heraeus, Hanau; Hettich, Tuttlingen; Eppendorf, Hamburg

3.1.4 Enzyme

Proteinase K	Sigma-Aldrich, Stammheim
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot

3.1.5 Stammlösungen und Puffer

BES/NaOH, pH 6.95/6.96/6.97	50 mM BES
	273 mM NaCl
	1,9 mM Na ₂ HPO ₄ → steril filtrieren
Blocking solution, pH 8.0	50 mM Tris
	0.14 M NaCl
	1% BSA (w/v)
Coating Buffer, pH 9.6	0,05 M Carbonate-Bicarbonate
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH
	1,5 M NaCl

Depurinierungslösung	0,2 M	HCl
DNA-Auftragspuffer (6x)	1 ml	10x TAE-Puffer
	1 ml	Orange G [10 mg/ml]
	5 ml	Glycerin
	3 ml	ddH ₂ O
Hybridisierungspuffer		Sigma-Aldrich, Stammheim
Prähybridisierungslösung	30 ml	Hybridisierungspuffer
	300 μ l	Lachssperma-DNA [10 mg/ml]
		→ zuvorige Denaturierung (96°C, 5 Min.)
Neutralisationslösung, pH 8.0	0,5 M	Tris
	3 M	NaCl
P1-Puffer	50 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	10 mM	EDTA
	100 μ g/ml	RNase A
		→ Aufbewahrung bei 4°C
P2-Puffer	200 mM	NaOH
	1%	SDS (w/v)
P3-Puffer, pH 5.5	3 M	Kaliumacetat
Ponceau-Färbelösung	0,2%	Ponceau S (w/v)
	5%	Essigsäure (v/v)

Material und Methoden

RIPA-Puffer, pH 7.4	50 mM Tris/HCl, pH 7.4
	1% NP-40 (w/v)
	0.25% Natriumdeoxycholat (w/v)
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
vor jeder Anwendung frisch dazu gegeben:	2 x Protease Inhibitor Cocktail
	1 mM Pefablock
	1 mM NaF
	1 mM β -Glycerolphosphat
	0,1% SDS (w/v)
	1 mM Na_3VO_4
	1 mM PMSF
	1 mM Benzamidin
	1 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin A
Sample/Conjugate Diluent	50 mM Tris
	0.14 M NaCl
	1% BSA (w/v)
	0.05% Tween20 (v/v)
SDS-Laufpuffer (5x)	248 mM Tris
	2 M Glycin
	17 mM SDS
SDS-Probenpuffer (3x)	0,24 M Tris/HCl, pH 6.8
	6% SDS (w/v)
	3% Glycerin (v/v)
	1,6% β -Mercaptoethanol (v/v)
	0,6 mg/ml Bromphenolblau
SSC-Puffer (20x), pH 7.0	3 M NaCl
	0,3 M Natriumcitrat
Stop Solution	0.18 M H_2SO_4
Strip-Lösung	0,2 M NaOH
	0,1% SDS (w/v)

TE-Puffer, pH 8.0	10 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	1 mM	EDTA
TNE-Puffer	100 mM	Tris/HCl, pH 8.5
	5 mM	EDTA, pH 8.5
	200 mM	NaCl
	0,1%	SDS (w/v)
Transferpuffer	48 mM	Tris/HCl, pH 7.5
	39 mM	Glycin
	20%	Methanol (v/v)
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (50x)	2 M	Tris/HCl, pH 8.0
	0,05 M	EDTA
	1 M	Essigsäure
TSB-Puffer		LB-Medium
	5%	DMSO (v/v)
	10%	PEG 4000 (w/v)
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄ → autoklavieren
Waschlösung I	2 x	SSC
	0,1%	SDS (w/v)
Waschlösung II	0,5x	SSC
	0,1%	SDS (w/v)
Waschpuffer, pH 8.0	50 mM	Tris
	0.14 M	NaCl
	0.05%	Tween20 (v/v)
KCM (5x)	500 mM	KCl
	150 mM	CaCl ₂
	250 mM	MgCl ₂ → autoklavieren

3.1.6 Antikörper und -seren

3.1.6.1 Erstantikörper für Western Blots

Antikörper	Herkunft	Konzentration	Referenz
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)	Kaninchen	1:1.000	Cell signaling, Boston, USA
Rabbit polyclonal to DUSP5 (ab54549)	Kaninchen	1:1.000	Abcam, Cambridge, UK
Flag-Taq DYKDDDDK Epitop Taq (Biotin)	Kaninchen	1:500	ABR Affinity BioReagents™, Golden, USA
DUSP5 (Rabbit polyclonal Antibody) 5552 Sequenz: CVDVKPTSQEKIEGER	Kaninchen	1:1.000	Eurogentec, Seraing, Belgien
α Tubulin	Maus	1:1.000	Merck, Darmstadt

3.1.6.2 Zweitantikörper für Western Blots

Antikörper	Herkunft	Konzentration	Referenz
Anti-Maus IgG (H+L)-HRP	Ziege	1:3.000	Bio-Rad, München
Anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRP	Ziege	1:3.000	Bio-Rad, München

3.1.6.3 FACS-Antikörper

Antikörper	Isotyp-Kontrollen	Klonalität	Hersteller
rat anti-mouse B220 (APC)+ (FITC)	rat IgG2a	monoklonal, Klon RA3-6B2	BD Biosciences
hamster anti-mouse CD3 (FITC)	hamster IgG	monoklonal	Invitrogen
rat anti-mouse CD4 (APC)	rat IgG2b	monoklonal, Klon RM4-5	BD Biosciences
rat anti-mouse CD8a (FITC)	rat IgG2a	monoklonal	Caltag Laboratories
rat anti-mouse CD11b (APC)	rat IgG2b	monoklonal	Invitrogen
rat anti-mouse CD19 (FITC)	rat IgG2a	monoklonal	Invitrogen
rat anti-mouse CD25 (FITC)	rat IgM	monoklonal, Klon 7D4	BD Biosciences
anti-mouse CD44 (PE)	rat IgG2b	monoklonal, Klon IM7	BD Biosciences
rat anti-mouse CD62L (FITC)	rat IgG1	monoklonal, Klon MEL-14	BD Biosciences
rat anti-mouse CD62L (PE)	rat IgG2a	monoklonal, Klon MEL-14	BD Biosciences
hamster anti-mouse CD69 (FITC)	armenian hamster IgG1	monoklonal, Klon H1.2F3	BD Biosciences
rat anti-mouse IgM (FITC)	rat IgG2a	monoklonal, Klon II/41	BD Biosciences
anti-mouse F4/80 (PE)	rat IgG2b	CI:A3-1/Ratte	BD Biosciences
Fc-Block CD16/32		2.4G2/Ratte	Caltag Laboratories
Isotyp-Kontrollen	Hersteller		
rat IgG2a (FITC)	Invitrogen		
rat IgG2a (APC)	Invitrogen		

ratIgG2b (APC)	Caltag Laboratories
ratIgM (FITC)	BD Biosciences
ratIgG1 (FITC)	Caltag Laboratories
hamster IgG (FITC)	BD Biosciences

3.1.7 Oligonukleotide

Die Synthese aller Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Metabion, München.

Oligonukleotide zur Generierung des Inaktivierungsvektors:

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')*
5'PrLA5	gagagagcggccgcGTGTAGCCTGAGACATCAGG
3'PrLA5	gagatatctagaAGTCCAGTTAAACTGTTGTCC
5'PrSA	gagagactcgagCCTTGCAACACGTCAGCGCC
3'PrSA	gagagaggtaccacgcgtCAGCACCTCTCTTAACTAGG
3'PrLnA-3.2	gagagatatcTCCCAAGCGCACGTCAAACC
5'PrLnA-3.3	gagagagaattcAGCTGCCCAGAACCACAGAG
<i>loxP</i> -fw	ctagaggatccATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATg
<i>loxP</i> -rev	aattcATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATggatcct

* Kleinbuchstaben zeigen Sequenzen der Restriktionsschnittstellen

Oligonucleotide zur Generierung der Sonden für die Southern Blot Analyse:

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
Dusp5 _{sonde2} -for	TGA AAG TAG ACT CAC TCT GG
Dusp5 _{sonde2} -rev	TT ACA GAC TGA TGC TAA TCC

Oligonukleotide zur Generierung der DUSP5-Promoterfragmente:

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
5'Prom	GAG AGA ACG CGT TTG CTG GGC TGA TTG ATT GG
3'Prom-1	GAG AGA CTC GAG CGA CGC TGC GCG CCC CAC AG
Prom _{fw} (-600)	GAA CGC GTA AGC TCG GGT GGT ACA TTG
Prom _{fw} (-400)	GAA CGC GTA GTA TCA AGA TGA CCA AGC C

Oligonukleotide zum Screening der ES-Zell-Klone und zur Genotypisierung der DUSP5^{-/-} Mäuse:

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
scr2	CTG CAG GCA GCT CTC GGA GG
scr1wtfor	CTG CAC CCT GTG TTA CCA GG
neo rev P screen	GAA AGT ATC CAT CAT GGC TGA TG
Pfw1	GCT GAT TGA TTG GAT AGC
Prev1	CGA AGT TAT GGA TCC TCT
P116	CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG
P117	CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC
P118	TTA CAG TCG GCC AGG CTG AC
Del Cre sense	ACCAGCCAGCTATCAACTCG
Del Cre antisense	TTACATTGGTCCAGCCACC

Oligonukleotide für die qRT-PCR:

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
m_DUSP5_F	TGC ACC ACC CAC CTA CAC TA
m_DUSP5_R	CCT CCT TCT TCC CTG ACA CA
mPPIA_F	GAG CTG TTT GCA GAC AAA GTT C
mPPIA_R	CCC TGG CAC ATG AAT CCT GG
m_β-Aktin FP	ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC

m_β-Aktin RP	AGC CAA GTC CAG ACG CAG G
DUSP5.2	ATG TCA GCA GTG TGG CTG
DUSP5.1	TGC ACC ACC CAC CTA CAC TA
mTNFa fwd	AAA ATT CGA GTG ACA AGC CTG TAG C
mTNFa rev2	GTG GGT GAG GAG CAC GTA G

3.1.8 Reagenzienkits

Kit	Hersteller
Dual-Luciferase [®] Reporter Assay	Promega, Mannheim
EndoFree [®] Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
FailSafe [™] PCR PreMix Selection Kit	Biozym, Oldendorf
FuGENE [®] HD Transfection Reagent	Roche, Mannheim
IgG1 ELISA	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
IgG2b ELISA	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
IgM ELISA	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
jetPEI [™] Macrophage transfection reagent	Peqlab, Erlangen
jetPEI [™] DNA transfection reagent	Peqlab, Erlangen
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN [®] Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIA shredder [™]	Qiagen GmbH, Hilden
Quantikine [®] TNF-α/TNFSF1A	R&D, Lille, Frankreich
QuantiTect [®] Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH, Hilden
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, Leek, NL

3.1.9 Medien

3.1.9.1 Nährmedien für Bakterienkulturen

LB-Medium, pH 7.0	1% Trypton (w/v)
	0,5% Hefe-Extrakt (w/v)
	1% NaCl (w/v)
SOC-Medium, pH 7.2	2% Trypton (w/v)
	0,5% Hefe-Extrakt (w/v)
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄ →autoklavieren
20 mM Glukose (sterilfiltriert)	

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium 1,5% Agar zugefügt.

3.1.9.2 Nährmedien für Zellkulturen

Zellkultur-Medien:

Medium	Hersteller
VLE RPMI 1640	Biochrom, Berlin
DMEM	Invitrogen, Leek, NL
Opti-MEM I	Invitrogen, Leek, NL
PBS	Biochrom, Berlin

Zusätze für Zellkultur-Medien:

Zusatz	Hersteller
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
FCS Gold	PAN, Aidenbach
FCS	Biochrom, Berlin
LIF	Laboreigene Herstellung
Mitomyzin C	Sigma-Aldrich, Stammheim
β -Mercaptoethanol	Invitrogen, Leek, NL
G418	Sigma-Aldrich, Stammheim
Ganciclovir	Sigma-Aldrich, Stammheim
L-Glutamin	Biochrom, Berlin

Zelltyp-spezifische Medienzusammensetzung:

	ES	EF	humane oder murine Zelllinien	MΦ- Medium
Basismedium	DMEM	DMEM	DMEM RPMI	RPMI
Zusätze				
FCS Gold (v/v)	15%	5%		
FCS (v/v)			7% bzw. 10%	10%
Penicillin	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml
Streptomycin	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml
L-Glutamin	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
β-ME	0,05 mM	0,05 mM		0,05 mM
LIF (v/v)	1%			
L929-Überstand				20%
Selektions- /Inhibitionszusätze				
G418	200 µg/ml		1800 µg/ml	
Ganciclovir	2 µM			
Mitomycin C		10 µg/ml		

Um Zellen einzufrieren wurde dem jeweiligen Kulturmedium 10% DMSO und 20% FCS zugesetzt. Bei dem ES-Einfriermedium wurde zusätzlich die FCS-Konzentration von 15% auf 25% erhöht.

Bei stabilen Transfektanten wurde das entsprechende Antibiotikum in das Kulturmedium zugegeben.

Antibiotika der Prokaryoten-Kulturen

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in ddH ₂ O, sterilfiltriert	100 µg/ml
Kanamycin	100 mg/ml in ddH ₂ O, sterilfiltriert	100 µg/ml

3.1.10 Bakterien und Zelllinien

Bakterien:

<i>E.coli</i> TOP10	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG
<i>E.coli</i> DH5α	fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1, relA1, endA1, thi-1, hsdR17
<i>E.coli</i> JM110	rpsL thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) ΦF' traD36 proAB lacIqZΔM15

Zellen und Zelllinien:

EF-Zellen	Embryonale Fibroblasten, gewonnen aus Embryonen d 14.5 postcoitum aus CD1-Mäusen Laboreigene Herstellung
ES-Zellen E14.1	Embryonale Stammzellen; isoliert aus dem Mausstamm 129/SvJ Ola Joyner, Toronto, Kanada Referenz: Kuhn <i>et al.</i> (88)
Hek 293	Humane embryonale Nieren-Zelllinie ATCC: CRL-1573™, Rockville, Maryland, USA Referenz: Graham <i>et al.</i> (89)
RAW 264	Murine Makrophagen-Zelllinie ATCC: TIB-71™, Rockville, Maryland, USA Referenz: Raschke <i>et al.</i> (90)

3.1.11 Versuchstiere

Die DUSP5-Knockout Mäuse wurden im optimierten Hygienebereich des Zentrums für Präklinische Forschung am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München gezüchtet, auf einen C57BL/6-N-Hintergrund rückgekreuzt und gehalten.

Mausstamm	Herkunft
C57BL/6-N	Charles-River, Wilmington, USA
LysMCre	Irmgard Förster, Universität Köln
Deleter-Cre	Jürgen Ruland, III. Med. Klinik, MRI, München

3.1.12 Klonierungsvektoren/Plasmide

Vektor	Funktion	Referenz
pCR [®] 2.1 TOPO [®]	Klonierungsvektor	Invitrogen, Leek, NL
pBluescript II KS(-)MCS+	Klonierungsvektor	Stratagene, La Jolla, USA
pEFsem	Expressionsvektor	Laboreigene Herstellung Konstrukt aus pcDNA3 (Referenz: Invitrogen) und pEF-BOS (Referenz: Seiichi Mizushima und Shigekazu Nagata (91))
pEGFP-N1	Expressionsvektor für GFP	Clontech, Mountain View, USA
pGL3-Basic Vector	Luciferaseexpressionsvektor	Promega, Madison, USA
pGL3-Promoter Vector	Luciferaseexpressionsvektor	Promega, Madison, USA
pGL3-Enhancer Vector	Luciferaseexpressionsvektor	Promega, Madison, USA

Im Rahmen dieser Arbeit generierte Expressionsvektoren:

Vektor	Relevante Eigenschaften
Inaktivierungsvektor	pBluescript II KS(-)MCS+ mit Insertion: genomische DNA aus Maus, <i>dusp5</i> -Lokus: TK-Kassette (2,8 kb) <i>NotI</i> , LA5' (1,4 kb) <i>NotI/XbaI</i> , <i>loxP</i> -Stelle durch Oligolinker (34 bp+ <i>XbaI/EcoRI</i> Schnittstellen, LA3' (E1) (1,4 kb) <i>EcoRI/EcoRI</i> , neo ^R <i>EcoRV/XhoI</i> , KA (0,5 kb) <i>XhoI/KpnI</i>
pEFsem_DUSP5	pEFsem mit <i>EcoRI/NotI</i> _3xFlag-DUSP5-Insertion
pEFsem_ΔNLS	pEFsem mit <i>EcoRI/NotI</i> _3xFlag-DUSP5ΔNLS- Insertion
pEFsem_C263S	pEFsem mit <i>EcoRI/NotI</i> _3xFlag-C263S-Insertion
pGL3-Promoter_ <i>Dusp5</i> (-400 bp)	pGL3-Promoter mit <i>MluI/XhoI-Dusp5</i> (-400 bp)- Insertion
pGL3-Promoter_ <i>Dusp5</i> (-600 bp)	pGL3-Promoter mit <i>MluI/XhoI-Dusp5</i> (-600 bp)- Insertion
pGL3-Promoter_ <i>Dusp5</i> (-1000 bp)	pGL3-Promoter mit <i>MluI/XhoI-Dusp5</i> (-400 bp)- Insertion

Zur Herstellung des DUSP5-Überexpressionsvektor wurde der *dusp5* codierende Bereich der Maus von der Firma GenScript Corporation, USA synthetisiert. Die Sequenz wurde dabei Codon-optimiert. Ausgehend von diesem Fragment erfolgte die Herstellung der beiden Vektoren pEFsem_ΔNLS und pEFsem_C263S durch *in vitro* Mutagenese, durchgeführt von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg.

3.2 Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle beschriebenen Methoden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Isolierung von RNA aus Mauszellen

Das Prinzip der RNA-Isolierung besteht aus einer Zellyse mit Inaktivierung der RNasen und anschließender Isolierung der Gesamt-RNA, die nur zu circa 2% aus mRNA besteht. Die Isolierung erfolgte unter Verwendung des RNeasy[®] Mini Kit und QIAshredder[™] Säulchen, beides von Qiagen. Alle verwendeten Puffer sind im Kit enthalten. Zur Isolierung der RNA aus Mausemakrophagen wurden 5×10^6 Zellen in 600 μ l RLT-Puffer mit β -Mercapthoethanol [10 μ l/ml] lysiert. Die vollständige Lyse erfolgte daran anschließend durch Inkubation für mindestens 1 Stunde bei -80°C . Anschließend wurden die lysierten Zellen auf Eis aufgetaut und auf ein QIAshredder[™] Säulchen pipettiert. Durch Zentrifugation für 2 Min. bei 13.000 rpm wurden die Zellen homogenisiert. Der Durchlauf wurde mit 600 μ l Ethanol [70%] gemischt und der Ansatz auf das RNeasy Mini Spin Column gegeben, welches anschließend für 30 Sek. bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Das RNeasy Mini Spin Column wurde dann mit 700 μ l RW1-Puffer mittels Zentrifugation für 30 Sek. bei 10.000 rpm gewaschen und nach Zugabe von 500 μ l RPE-Puffer erneut für 30 Sek. bei 10.000 rpm zentrifugiert. Nach erneuter Zugabe von 500 μ l RPE-Puffer wurde das Säulchen für 2 Min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Elution erfolgte dann durch 1 minütige Zentrifugation bei 10.000 rpm mit 30 μ l RNase freiem H_2O , welches zuvor bis zu 10 Min. auf dem Säulchen inkubiert wurde. Die Konzentration der isolierten RNA wurde im NanoDrop[®] ND-1000 vermessen und die isolierte RNA direkt zur cDNA-Synthese (3.2.1.3) eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

3.2.1.2 Isolierung von RNA aus Zelllinien

Die Isolierung der RNA aus Zelllinien erfolgte nach Protokoll 3.2.1.1, jedoch wurde hier auf den Homogenisierungsschritt mit den QIAshredder[™] Säulchen verzichtet.

3.2.1.3 Reverse Transkription zur cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus der isolierten RNA erfolgte mithilfe des QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit von Qiagen. Alle verwendeten Reagenzien sind im Kit enthalten. Es wurde ein 14 μ l Ansatz bestehend aus 2 μ l gDNA Wipeout Buffer (7x), 1 μ g Template RNA und der

entsprechenden Menge H₂O für 2 Min. bei 42°C inkubiert. Zur diesem Ansatz wurden dann 1 µl Reverse Transcriptase, 4 µl RT Puffer (5x) und 1 µl RT Primer Mix gegeben. Der 20 µl Ansatz wurde zunächst 15 Min. bei 42°C und danach 3 Min. bei 95°C inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert oder direkt zur Quantitativen Real-Time PCR (3.2.1.7) eingesetzt.

3.2.1.4 Isolierung genomischer DNA aus Gewebe oder Zellen

Mausschwanz-Biopsien oder Zellpellets wurden in 500 µl TNE-Lysepuffer, 50 µl SDS [10%] und 10 µl Proteinase K [10 mg/ml] über Nacht bei 56°C auf einem Thermoschüttler verdaut. Nach dem vollständigen Verdau der Probe wurde die DNA entsprechend der anschließenden Verwendung unterschiedlich aufgereinigt (3.2.1.4.1 bzw. 3.2.1.4.2).

3.2.1.4.1 Aufreinigung von Mausschwanz DNA

Die lysierten Zellen (3.2.1.4) wurden mittels Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 Min. pelletiert und 500 µl des Überstandes in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Überstand wurden 500 µl kurz zuvor gemischtes Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol gegeben und der gesamte Ansatz für 1 Min. durch vortexen gemischt. Anschließend erfolgte durch 10 minütige Zentrifugation bei 11.000 rpm und RT die Phasentrennung. Die wässrige obere Phase wurde zu 900 µl eiskaltem Ethanol [100%] gegeben, gut geschüttelt und bei 13.000 rpm und 4°C für 5 Min. zentrifugiert. Das Pellet wurde durch Zugabe von 500 µl Ethanol [70%] und anschließender Zentrifugation (13.000 rpm, 4°C, 5 Min.) erneut gewaschen. Nach vollständiger Trocknung des DNA-Pellets bei RT wurde die DNA in 200 µl TE-Puffer [+RNase (100µg/ml)] gelöst. Die Lagerung der DNA bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei 4°C.

3.2.1.4.2 Isolierung genomischer DNA aus Zellen

Durch Zentrifugation (13.000 rpm, 5 Min.) wurden die lysierten Zellen (3.2.1.4) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, 500 µl zuvor gemischtes Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol dazugegeben. Nach vortexen des Ansatzes für 1 Minute folgte die Phasentrennung durch Zentrifugation (13.000 rpm, RT, 10 Min.). Die wässrige obere Phase wurde dann in 950 µl eiskaltes Ethanol [100%] überpipettiert und geschüttelt bis die DNA als feiner durchsichtiger Faden sichtbar wurde. Die DNA wurde dann mithilfe einer Pipettenspitze vorsichtig ‚herausgehäkelt‘, kurz in Ethanol [70%] geschwenkt und dann durch

Inkubation für 1 Stunde bei 37°C in 200 µl TE-Puffer gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C.

3.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Stämmen

Die eingesetzten Alkalischen Lysen beruhen, wie auch die Lyse bei den QIAGEN® Plasmidisolierungs-Kits auf einer modifizierten alkalischen Lyse (92), verzichten jedoch auf eine chromatographische Aufreinigung der DNA.

3.2.1.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (allgemein)

Die im Folgenden beschriebene Methode wurde eingesetzt, wenn eine große Anzahl an Klonen schnell untersucht werden sollte. Einzelne Klone einer frisch transformierten Platte (3.2.2.5.2 bzw. 3.2.2.5.3) wurden in je 2 ml LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Kultur wurde bei 8.000 rpm für 1 Min. zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 300 µl P1-Puffer durch vortexen resuspendiert. Zu diesem Ansatz wurden 300 µl P2-Puffer gegeben, durch mehrmaliges invertieren gemischt und für 5 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden 300 µl P3-Puffer dazugegeben und dieser Ansatz kräftig geschüttelt und bei 13.000 rpm und 4°C für 15 Min. pelletiert. In der Zwischenzeit wurden frische Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 800 µl Isopropanol vorbereitet. Der Zentrifugationsüberstand wurde zum Isopropanol gegeben und erneut 13.000 rpm für 15 Min. und 4°C zentrifugiert und das Pellet anschließend mit 800 µl Ethanol [70%] durch Zentrifugation gewaschen (13.000 rpm, 5 Min.). Das darauf resultierende Pellet wurde bis zur vollständigen Trockenheit bei RT inkubiert und anschließend in 50 µl H₂O resuspendiert. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

3.2.1.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (rein)

Plasmid-DNA die zur Klonierung oder Sequenzierung eingesetzt wird erfordert einen hohen Reinheitsgrad und erfolgte daher unter Verwendung des QIAprep® Spin Miniprep Kit von Qiagen. Dazu wurden einzelne Klone einer frisch transformierten Platte (3.2.2.5.2 bzw. 3.2.2.5.3) in je 2 ml LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers und mit den Komponenten des verwendeten Kits.

3.2.1.5.3 Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab (rein)

Wurden zur Klonierung größere Mengen Plasmid-DNA benötigt wurden diese mithilfe des

QIAGEN[®] Plasmid Midi Kit von Qiagen isoliert. Dazu wurden 100 ml einer LB [+Antibiotikum] über Nacht Kultur bei 4.000 rpm für 15 Min bei 4°C zentrifugiert. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.2.1.5.4 Plasmid-DNA-Isolierung für Transfektionsexperimente

Endotoxine sind Bestandteil der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien und schon in geringen Mengen biologisch wirksam. Sie sind für eine starke Verminderung der Transfektionseffizienz verantwortlich. Aus diesem Grund wurde für alle Transfektionsexperimente Plasmid-DNA mit einer speziellen Methode isoliert, die Endotoxin-Freiheit garantiert. Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurden 250 ml LB-Medium [+ Antibiotikum] im Erlenmeyerkolben mit Schikane mit 50 µl Bakterienkultur (oder 5 µl Glycerinkultur) angeimpft. Die Bakterienkultur wurde über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Durch Zentrifugation (4.000 rpm, 15 Min., 4°C) wurde die Kultur pelletiert. Zur anschließenden Lyse der Bakterien und der Isolierung der darin enthaltenen Plasmid-DNA wurde das EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit von Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.2.1.6 Amplifikation von DNA durch die Polymerase Kettenreaktion

Bei der Polymerase Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine von Kary Mullis (93) entwickelte Methode, mit der ein definierter DNA-Abschnitt *in vitro* vervielfältigt werden kann. Zur Vervielfältigung der durch spezifische Oligonukleotide (Primer) definierten DNA-Sequenz wird dabei eine zyklische Wiederholung dreier Schritte benötigt. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA bei 94°C hitzedenaturiert, d.h. durch Erhitzen wird die doppelsträngige DNA durch Lösen der Wasserstoffbrücken in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Daran anschließend erfolgt die Anlagerung (Annealing) der gegenläufigen, zur DNA komplementären Primer. Diese Anlagerungstemperatur ist abhängig vom GC-Gehalt des Primers und muss für jedes Primerpaar experimentell optimiert werden. Der daraus resultierende kurze DNA-Doppelstrang wird dann durch eine spezielle hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*), deren optimale Enzymaktivität bei 72°C liegt, verlängert (Elongation). Die Synthese findet in 3'→5'-Richtung statt. Somit sind nach dem Elongationsschritt aus einem Doppelstrang zwei neue DNA-Stränge entstanden. Durch die zyklische Wiederholung dieser Schritte (30 - 35x) findet eine exponentielle Amplifikation des jeweiligen DNA-Abschnittes statt. Die Dauer der einzelnen Schritte variiert dabei entsprechend der Größe des gewünschten PCR-Produktes und wird mit circa

1 Minute/kbp berechnet. In Tabelle 1 ist in einer Übersicht die Zusammensetzung sämtlicher in dieser Arbeit verwendeten PCR-Ansätze angegeben.

Tabelle 1: PCR-Ansätze für Klonierungskonstrukte, ES-Screening, Genotypisierungen.

PCR	Primer [0,2-0,4 μ M]	MgCl ₂	Puffer	Polymerase 2-5 Units/Ansatz
LA3'-DUSP5 KO	5'PrLA3.3/ 3'PrLA3.2	-	2xPreMix H	FailSafe Enzyme Mix
LA5'-DUSP5 KO	5'PrLA5/ 3'PrLA5	2 mM	10xHigh Fidelity+[10% DMSO]	HF Enzyme Mix (Fermentas) Hotstart
KA-DUSP5 KO	5'PrSa/ 3'PrSA	2,25 mM	10xTaq.Puf.+KCl+[10% DMSO]	Taq-Polymerase; Hotstart
Promoter (-1000)	5'Prom/ 3'Prom-1	1,25 mM	10xTaq.Puf.+(NH ₄) ₂ SO ₄ +[10% DMSO]	Taq-Polymerase; Hotstart
Promoter (-600)	Promfw(-600)/ Promrev2	2 mM	10xTaq.Puf.+(NH ₄) ₂ SO ₄ +[10% DMSO]	Taq-Polymerase; Hotstart
Promoter (-400)	Promfw(-400)/ Promrev2	2 mM	10xTaq.Puf.+(NH ₄) ₂ SO ₄ +[10% DMSO]	Taq-Polymerase; Hotstart
ES-Zell Screening	scr2/ neorevPscreen	2 mM	10xTaq.Puf.+(NH ₄) ₂ SO ₄ +[10% DMSO]	Taq-Polymerase; Hotstart
LysMCre	P116/ P117/P118	1,5 mM	10xTaq.Puf.+(NH ₄) ₂ SO ₄ +[10% DMSO]	Taq-Polymerase; BSA (20 mg/ml)
DUSP5 flox	scr2/ neorevPscreen	2 mM	10xTaq.Puf.+(NH ₄) ₂ SO ₄ +[10% DMSO]	Taq-Polymerase; Hotstart
DUSP5 KO	Pfw1/scr2	-	2xPreMix E	FailSafe Enzyme Mix
Cre Del	Cre Del sense/ antisense	2,5 mM	Taq.Puf.+KCl+[10% DMSO]	Taq-Polymerase; Hotstart
DUSP5 WT	scr2/scr1wtfor	1,5 mM	5 μ l Taq.Puf.+(NH ₄) ₂ SO ₄ +[10% DMSO]	Taq-Polymerase; Hotstart
<i>loxP</i> -Nachweis	Pfw1/Prev1	2 mM	Taq.Puf.+KCl+[10% DMSO]	Taq-Polymerase; Hotstart

Es wurden jeweils 50 μ l Ansätze hergestellt. Standardmäßig wurden für einen PCR-Ansatz 100-200 ng Template-DNA eingesetzt. Nach Zugabe des Reaktionspuffers, dNTPs [10 -15 mM] als Bausteine für den zu synthetisierenden Strang und MgCl₂, sowie den *sense* und *antisense* Primern wurde im Allgemeinen ein „Hotstart“ durchgeführt, d.h. die Polymerase wurde erst nach der Denaturierung (5 Min. bei 94°C) zum PCR-Ansatz gegeben.

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 2 in einer Übersicht zusammengestellt.

Tabelle 2: PCR-Programme für Klonierungskonstrukte, ES-Screening, Genotypisierungen.

PCR	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklusanzahl
LA3'-DUSP5 KO	94°C, 60 Sek.	59°C, 45 Sek.	72°C, 90 Sek.	35
LA5'-DUSP5 KO	94°C, 60 Sek.	58°C, 45 Sek.	72°C, 90 Sek.	35
KA-DUSP5 KO	94°C, 60 Sek.	58°C, 45 Sek.	72°C, 45 Sek.	35
Promoter (-1000)	94°C, 60 Sek.	59°C, 60 Sek.	72°C, 90 Sek.	35
Promoter (-600)	94°C, 60 Sek.	57°C, 60 Sek.	72°C, 60 Sek.	35
Promoter (-400)	94°C, 60 Sek.	57°C, 60 Sek.	72°C, 60 Sek.	30
ES-Zell Screening	94°C, 60 Sek.	60°C, 60 Sek.	72°C, 60 Sek.	30
LysMCre	94°C, 60 Sek.	62°C, 60 Sek.	72°C, 120 Sek.	35
DUSP5 flox	94°C, 60 Sek.	60°C, 60 Sek.	72°C, 60 Sek.	30
DUSP5 KO	94°C, 60 Sek.	60°C, 60 Sek.	72°C, 180 Sek.	30
Cre Del	95°C, 30 Sek.	64°C, 30 Sek.	72°C, 30 Sek.	40
DUSP5 WT	94°C, 60 Sek.	59°C, 45 Sek.	72°C, 60 Sek.	30
<i>loxP</i> -Nachweis	94°C, 60 Sek.	55°C, 45 Sek.	72°C, 30 Sek.	30

Um sicher zustellen, dass die in der PCR als Template eingesetzte DNA als Einzelstrang vorlag, wurde der erste Denaturierungsschritt um 2 Min. verlängert. Bei der Durchführung eines *Hot Starts* wurden erst daran anschließend die Polymerase zugegeben. Nach dem letzten Elongationsschritt folgte ein Inkubationsschritt für 7-10 Min. bei 72°C. Danach wurde das PCR-Produkt bis zur weiteren Verarbeitung auf 4°C abgekühlt.

3.2.1.7 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Gen-spezifische Menge an mRNA kann durch die Real-Time PCR bestimmt werden. Bei dieser Methode wird durch quantitativen Nachweis der während der PCR gebildeten cDNA die Menge der eingesetzten mRNA berechnet. Es wurde das SYBR[®] Green System verwendet. Bei diesem System bindet der Farbstoff (SYBR Green) als Fluorogene Sonde unspezifisch an doppelsträngige DNA. Die Fluoreszenz ist hierbei um ein vielfaches höher als bei der Bindung an Einzelstrang-DNA. Die Fluoreszenz nimmt somit im Verlauf eines PCR-Laufs proportional zur Menge der amplifizierten PCR-Produkte zu. Am Ende eines PCR-Laufs wird anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung (ausschließlich exponentielle Phase) der PCR vorgenommen. Durch Korrelation des logarithmischen Anstiegs mit dem entsprechenden Zyklus im Vergleich zu einem ubiquitär exprimierten Kontroll-Gen erhält man eine quantitative Aussage.

Zur qRT-PCR wurde ein 30 μl Ansatz bestehend aus 5 μl cDNA [10 ng/ μl], 15 μl SYBR[®] Green-Mastermix (2x), 1 μl sense Primer [20 nM] und 1 μl antisense Primer [20 nM] und 8 μl ddH₂O zusammen in eine 96 *well semi-skirted* PCR Platte (starlab) pipettiert und danach die qRT-PCR gestartet.

Ein Reaktionszyklus umfasste für gewöhnlich vier Schritte:

50 °C	120 sec	40 Zyklen
95 °C	600 sec	
95 °C	15 sec	
60 °C	60 sec	

Die Spezifität der Fluoreszenz wurde direkt im Anschluss eines Laufes durch Bestimmung der Schmelzpunkte der PCR-Produkte mittels der sogenannten Dissoziationskurve untersucht. Die qRT-PCR wurde mit dem ABIPrism™ 7300 Sequence Detector durchgeführt und mit dem Sequence Detection Software v.1.4 Programm ausgewertet.

3.2.1.8 Restriktionsspaltungen

Durch den Einsatz von Restriktionsendonucleasen kann ein DNA-Fragment untersucht werden. Restriktionsendonucleasen sind bakterielle Enzyme, die spezifische vier bis acht bp lange Sequenzen (Restriktionsschnittstellen) erkennen und beide DNA-Stränge an dieser Stelle schneiden. Dadurch entstehen spezifische Restriktionsfragmente. Aufgrund der Fragmentgrößen kann untersucht werden, ob das gewünschte DNA-Fragment amplifiziert wurde. Auch der Erfolg einer Klonierung kann auf diese Weise untersucht werden. Restriktionsspaltungen wurden wie in Tabelle 3 beschrieben, oder als Vielfaches dieses Ansatzes angesetzt.

Tabelle 3: Zusammensetzung einer Restriktionsspaltung.

Reagenz	Menge
DNA	7 μl
Puffer	1 μl
Enzym	1 μl
ddH ₂ O	1 μl

Der Ansatz wurde 1 h inkubiert (Inkubationstemperatur nach Angabe des Herstellers), mit DNA-Auftragspuffer versetzt und mithilfe eines Agarosegels [1%] aufgetrennt.

3.2.1.8.1 Sequenzierungen

Alle Kontrollsequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH in Ebersberg durchgeführt.

3.2.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.2.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Kultivierung der *E.coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C im Schüttelinkubator. Zur Stammhaltung von hergestellten *E.coli*-Klonen wurden diese in eine Glycerinkultur überführt. Hierzu wurden 6 ml einer Bakterienkultur in der stationären Phase in einem 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß für 8 Min. bei 2.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml LB-Medium und 1 ml Glycerin resuspendiert und bei -80°C gelagert.

3.2.2.2 Ligation

3.2.2.2.1 Ligation mit der T4-DNA-Ligase

Die T4-DNA-Ligase katalysiert in doppelsträngigen DNA-Molekülen die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyenden.

Bei der Ligation wurde ein molares Verhältnis von 1:3 (Vektor:Insert) verwendet, wobei immer 50 ng Vektor-DNA eingesetzt wurde. Die Menge an Insert wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$(\text{ng}_{\text{Vektor}} \times \text{kb}_{\text{Insert}}) / (\text{kb}_{\text{Vektor}} \times \text{molares Verhältnis}_{\text{Vektor/Insert}}) = \text{ng}_{\text{Insert}}$$

Der Ligationsansatz (Zusammensetzung siehe Tabelle 4) wurde über Nacht bei 16°C inkubiert und die ligierten Plasmide anschließend in kompetente Zellen transformiert.

Tabelle 4: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.

Reagenz	Menge
Insert	errechneter Wert
Vektor	50 ng
Puffer	1,5 μ l
T4 Ligase	1 μ l
ddH ₂ O	ad 15 μ l

3.2.2.2.2 Ligation mit dem TOPO TA Cloning® Kit

Für die direkte Ligation von PCR-Produkten wurde das TOPO TA Cloning® Kit verwendet. Die Besonderheit des verwendeten pCR2.1-TOPO-Vektors ist eine mit dem offenen Plasmid verknüpfte Topoisomerase, die einen anderen DNA-Strang mit dem Vektor verbinden kann und dabei freigesetzt wird. Ermöglicht wird dies durch die von der Topoisomerase I katalysierten spezifischen Spaltung des Phosphodiesterückgrates, die dabei eine kovalente Bindung mit der DNA ausbildet wobei am 3'-Ende ein Thymidinüberhang verbleibt. Da die Taq-Polymerase ihrerseits PCR-Produkte mit einem Adenosinüberhang am 3'-Ende herstellt ist eine direkte chemische Reaktion mit einer 5'-Hydroxylgruppe eines anderen DNA Stranges möglich. Dabei wird die Topoisomerase freigesetzt und die beiden DNA Stränge werden verbunden.

Da der A-Überhang jedoch instabil ist, sollte nur frisches PCR-Produkt eingesetzt oder ggf. eine A-Addition durchgeführt werden. Zur A-Addition wurde ein Ansatz aus 30 μ l aufgereinigtem PCR-Produkt (3.2.2.4.1), 1 μ l Taq-Polymerase [0,7 U - 1 U] und 1 μ l dNTPs pipettiert. Dieser Ansatz wurde für 10 Min. bei 72°C inkubiert, danach sofort auf Eis gestellt und in der Topo-TA-Klonierung eingesetzt. Zur Topo-TA-Klonierung wurden 4 μ l frisches PCR-Produkt oder durch A-Addition behandeltes PCR-Produkt, 1 μ l *salt solution* (Kit-Bestandteil) und 1 μ l Vektor gemischt und 30 Min. bei RT inkubiert und danach die Transformation (3.2.2.5.3) durchgeführt.

3.2.2.3 Dephosphorylierung eines Vektors

Wird ein Vektor mit nur einem Restriktionsenzym gespalten entstehen zwei kompatible Enden die miteinander religieren können. Dies kann durch Vektor-Dephosphorylierung verhindert werden. Nach dem Restriktionsverdau bleiben an den 5'-Enden der DNA-

Fragmente Phosphatreste zurück, die für die Ligation benötigt werden. Entfernt man diese mithilfe der Dephosphorylierungsaktivität einer Phosphatase kann keine Religation des Vektors mehr stattfinden. Das Fragment, das ligiert werden soll besitzt im Gegensatz dazu noch beide Phosphatreste und kann daher seinerseits mit dem Vektor ligieren.

Tabelle 5: Reaktionsansatz zur Dephosphorylierung eines Vektors.

Reagenz	Menge
Eluat	28 μ l
Alkalische Phosphatase	1 μ l
Puffer (10x)	5 μ l
ddH ₂ O	16 μ l

Die Vektordephosphorylierung (Reaktionsansatz siehe Tabelle 5) erfolgte bei Inkubation des Ansatzes für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurde erneut 1 μ l Alkalische Phosphatase dazugegeben und der Ansatz erneut für 30 Min. bei 37°C inkubiert.

3.2.2.4 Klonierung von PCR-Produkten in einen Vektor

3.2.2.4.1 Aufreinigung von PCR Produkten

Die Aufreinigung von PCR Produkten erfolgte mithilfe des QIAquick[®] PCR Purification Kit von Qiagen und wurde nach Angaben des Herstellers mit dem im Kit bereitgestellten Komponenten durchgeführt.

3.2.2.4.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Mithilfe des QIAquick[®] Gel Extraction Kit wurde DNA aus Agarosegelen eluiert. Dazu wurden die zu isolierenden DNA-Fragmente im UV-Licht sichtbar gemacht und unverzüglich mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die eluierte DNA wurde sofort im Versuch eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

3.2.2.5 Transformation von *E. coli*-Stämmen

Die Übertragung freier DNA in ein Rezipienten-Bakterium wird als Transformation bezeichnet. *E.coli* besitzt jedoch kein natürliches Transformationssystem, welches sie zur aktiven Aufnahme freier DNA befähigt. Folglich ist nur die passive Aufnahme der DNA nach entsprechender Vorbehandlung der Zellen möglich, die Zellen müssen kompetent gemacht

werden. Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurde die CaCl_2 -Methode eingesetzt. Bei dieser Methode nutzt man die Tatsache, dass *E.coli*-Zellen nach Behandlung mit hohen Konzentrationen an Ca^{2+} -Ionen *dsDNA* aufnehmen können (94).

3.2.2.5.1 Herstellung von kompetenten *E.coli*-Zellen

Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurde eine Vorkultur gezogen. Dazu wurden 1 μl Zellsuspension bzw. eine Bakterienkolonie in einem Erlenmeyerkolben mit 50 ml LB-Medium und Antibiotikum über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler angezogen. Am nächsten Morgen wurden 4 ml dieser Vorkultur in einen Erlenmeyerkolben mit 400 ml LB-Medium und Antibiotikum überimpft und circa 3 Stunden bis zu einer OD_{600} zwischen 0,5 und 0,6 angezogen. Die Bakteriensuspension wurde in einen Zentrifugenbecher überführt und mittels Zentrifugation für 10 Min. bei 4.000 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 25 ml eiskaltem TSB-Puffer resuspendiert und 10 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 μl Aliquots hergestellt und diese im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80°C.

3.2.2.5.2 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen

Zur Transformation wurden 5 μl Ligationsansatz (3.2.2.2.1) zu 20 μl KCM (5x) und 72 μl H_2O gegeben und alles zusammen kurz gevortext. Danach wurden 100 μl der auf Eis aufgetauten kompetenten *E.coli*-Zellen dazugegeben und der gesamte Ansatz 30 Min. auf Eis inkubiert und anschließend bei 42°C ein Hitzeschock (45 Sek.) durchgeführt. Danach wurden sofort 750 μl LB-Medium (ohne Antibiotikum) zugegeben und 1x invertiert. Zur Expression der Antibiotikaresistenzgene wurde der Ansatz 1 h bei 37°C im Thermoschüttler inkubiert. Nach Zentrifugation (8.500 rpm, 5 Min.) wurde das Pellet im Rücklauf resuspendiert und die Zellsuspension wurde dann auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.2.5.3 Transformation eines TOPO-TA-Ligationsansatzes

Zum Abschluss einer TOPO-TA-Klonierung wurden 4 μl des Ligationsansatzes (3.2.2.2.2) zu einem Aliquot chemisch kompetenter *E.coli* Top Ten One Shot[®] Zellen gegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Dieser Ansatz wurde 30 Min. auf Eis inkubiert und danach ein Hitzeschock bei 42°C (30 Sek.) durchgeführt. Zu diesem Ansatz wurden sofort 250 μl SOC-Medium gegeben und 1 h bei 37°C und 225 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Danach wurde der gesamte Ansatz mittels Verdünnungsausstrich auf die entsprechende

Selektionsplatten plattiert. Zur blau-weiß Selektion wurden die Selektionsplatten zuvor mit IPTG und X-Gal beschichtet.

3.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren unterschiedlicher Größe können durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt werden, da aufgrund der Siebstruktur der Agarose kleine DNA-Fragmente im elektrischen Feld Agarosegele schneller durchlaufen als große DNA-Fragmente. Dabei ist bei 0,8 - 2.0% Agarosegele die Laufstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge. Daher werden abhängig von der Größe der DNA-Fragmente die untersucht werden sollen Gele mit unterschiedlichen Agarosekonzentrationen eingesetzt.

Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer durch kurzes Aufkochen gelöst und dann mit Ethidiumbromid [50 ng/ml] versetzt. Anschließend wurde das Gel in einen Gelträger gegossen und erst nach vollständiger Polymerisierung zum Gellauf eingesetzt.

Vor dem Auftragen der DNA wurde dieser zum Absinken in die Taschen DNA-Auftragspuffer zugefügt. Nach Auftragen der Proben in die Taschen wurde das Gel in einem elektrischen Feld von 80 - 140 V [5 V/cm Elektrodenabstand] aufgetrennt. Als Referenzmarker wurden 6 μ l GeneRuler™ der Firma Fermentas verwendet.

Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und verändert dadurch das Adsorptionsspektrum. Nach Anregung mit UV-Licht erscheint der gebildete Komplex im sichtbaren Bereich als leuchtende DNA-Bande. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte im Gel Doc XR System.

3.2.2.7 Southern Blot

Bei der nach ihrem Erfinder Ed M. Southern (95) benannten Methode werden mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Länge getrennte DNA-Fragmente auf einer Membran fixiert, um später durch Hybridisierung mit markierten Sonden einzelne DNA Fragmente nachweisen zu können.

3.2.2.7.1 Verdau der genomischen DNA

Bevor die DNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden kann muss sie mithilfe von hochkonzentrierten (HC) Restriktionsendonukleasen verdaut werden. Zum Verdau der genomischen DNA wurde ein 60 μ l Restriktionsansatz hergestellt. Dazu wurden 20 μ g

genomische DNA, 150 Units des gewünschten Restriktionsenzym, 6 μ l Puffer und H₂O über Nacht im Thermoschüttler bei 37°C inkubiert.

3.2.2.7.2 Auftrennung der DNA mittels Agarosegelelektrophorese

Am nächsten Tag wurde ein 14x14 cm großes mit 200 ml Agarosegel [0,8%] und 14 Kammern hergestellt. Auf dieses Gel wurde der gesamte Verdau, dem zuvor 10 μ l DNA-Auftragspuffer zugegeben wurde aufgetragen. Als Marker wurde die GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder verwendet. Das Gel wurde über Nacht bei 20 V aufgetrennt. Am nächsten Tag wurde das Agarosegel mit einem Größenstandard (Lineal) fotografiert und das Gel vor der weiteren Behandlung in H₂O gewaschen.

3.2.2.7.3 Aufbau einer Southern Blots

Alle weiteren Behandlungsschritte erfolgten in einer Wanne. Zuerst wurde das Gel 20 Min. in HCL [0,25 M] inkubiert, wodurch die DNA teilweise depuriniert und fragmentiert. Anschließend wurde das Gel 2 Min. in H₂O gewaschen und danach zur Trennung der Doppelstränge 2 x für 20 Minuten in Denaturierungspuffer denaturiert. Das Gel wurde erneut in H₂O gewaschen und dann 2 x für 20 Min. in Neutralisierungspuffer inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte der Aufbau des Blottes, wie in Abbildung 5 dargestellt. Beim eingesetzten Prinzip des Blottens mit Hochsalzpuffer wird unter Ausnutzung der Kapillarkräfte 10 x SSC Puffer durch das Gel und die Membran in einen Stapel von Papiertüchern gesogen. Die DNA wandert mit und wird auf der Membran gebunden.

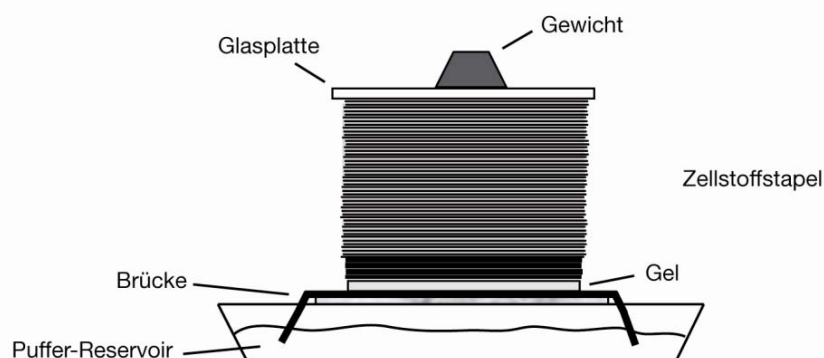


Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Kapillar-Blots zum Transfer zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran.

Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut, die Membran in 2 x SSC Puffer 2 Min. gewaschen und auf ein neues feuchtes Whatman Papier gegeben. Durch UV-Kreuzvernetzung

im *Crosslinker* wurde die transferierte DNA dann auf der Membran fixiert. Nach dem *Crosslinken* wurde die Membran zwischen zwei feuchte Whatman Papiere gelegt und in Folie eingeschweißt in der sie mehrere Tage bei 4°C gelagert werden kann.

3.2.2.7.4 Herstellung ³²P-markierter DNA-Sonden

Mittels PCR (3.2.1.6) wurden spezifische Sonden generiert und anschließend in den TOPO-TA-Vektor (3.2.2.2 und 3.2.2.5.3) kloniert. Nach Restriktionsverdau (3.2.1.8) und gelelektrophoresischer Auftrennung (3.2.2.6) wurde die Sonde aus dem Gel isoliert (3.2.2.4.2.). Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte wie im folgenden Abschnitt (3.2.2.7.5) beschrieben.

3.2.2.7.5 Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren

Die Nylonmembran mit den fixierten Nukleinsäure-Fragmenten wurde in ein Hybridisierungsröhrchen transferiert und im Anschluss daran die Prä-Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurde ein Aliquot mit 20 ml Hybridisierungspuffer (Sigma) auf 65°C erwärmt. Zu diesem Hybridisierungspuffer wurden 300 µl Lachssperma-DNA [10 mg/ml] gegeben. Diese wurde zuvor 5 Min. bei 95°C denaturiert, 10 Min. auf Eis inkubiert und dann in die Prä-Hybridisierungslösung pipettiert. Die Prä-Hybridisierung erfolgte über Nacht. Zur radioaktiven Markierung der Sonde wurden 25 ng Sonde in 45 µl TE-Puffer gelöst und für 5 Min. bei 95°C inkubiert und anschließend 10 Min. bei 4°C. Zu diesem Ansatz wurden 45 µl Rediprime II Random Primed Labeling System (GE Healthcare) und 5 µl dCTP (50 µCi ³²P-dCTP) gegeben. Dieser Ansatz wurde 20 Min. bei 37°C inkubiert. Zur Aufreinigung der Sonde wurde diese auf ein Säulchen pipettiert und 1 Min. bei 3.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Sonde für 5 Min. bei 95°C behandelt und danach 10 Min. auf Eis inkubiert. Die Hybridisierungslösung wurde bis auf 10 ml abgekippt und die Sonde dazugegeben und über Nacht inkubiert. Zum Waschen des Blots wurde dieser 2 x für 10 Min. mit 2 x SSC/SDS [0,1%] bei 65°C inkubiert. Daran anschließend wurde der Blot 1 x mit 0,5 x SSC/SDS [0,1%] gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt. Die Detektion der Signale erfolgte durch Exposition der Membran auf *phosphoimaging*.

Um die Membran für weitere Hybridisierungen einsetzen zu können, wurden gebundene Sonden entfernt indem die Membran zuerst kurz in H₂O gewaschen und anschließend für 30 Min. bei 37°C in Strip-Lösung inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran in 2 x SSC äquilibriert und konnte dann erneut prähybridisiert und hybridisiert werden.

3.2.3 Zellbiologische Methoden

3.2.3.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden an Sterilbänken durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte, falls nicht anders erwähnt, im Brutschrank bei 37°C, 7% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Begutachtung der Zellen erfolgte in regelmäßigen Abständen per Mikroskop, woraufhin die Zellen bei Bedarf mit frischem Medium versorgt bzw. bei Konfluenz der Zellen passagiert wurden. Dabei erfolgte die Ablösung adhärenter Zellen je nach Grad der Adhärenz durch Zellschaber, eine 5 bis 10 minütige Behandlung mit Biotin oder bei robusteren Zellen mit einer 5 bis 10 minütigen Behandlung mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (PAA, Parsching, Österreich) bei 37°C im Brutschrank. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von PBS oder frischem Zellkulturmedium. Wobei die Zellen anschließend 2 x PBS gewaschen wurden. Das Auftauen, Einfrieren und Passagieren der Zellen erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, nach Standardprotokollen (3.2.3.1.1, 3.2.3.1.2).

3.2.3.1.1 Zellen auftauen

Falls nicht anders beschrieben wurden die Zellen bei RT aufgetaut und sofort in Medium aufgenommen. Nach 1x waschen (18 °C, 1.500 rpm, 4 Min.) mit Medium wurden die Zellen falls nicht anders erwähnt auf einer 10 cm Zellkulturschale mit 10 ml Medium ausgesät.

3.2.3.1.2 Zellen einfrieren

Zum Einfrieren wurden die Zellen zentrifugiert (18 °C, 1.500 rpm, 4 Min.) und das Pellet anschließend in Einfriermedium resuspendiert. Der Ansatz wurde in Kryoröhrchen pipettiert und in einer Styroporbox bei -80°C eingefroren und nach 2 Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.3.1.3 Kultivierung embryonaler Mausstammzellen

Embryonale Stammzellen (ES) sind pluripotente Zellen aus der inneren Zellmasse muriner Blastozysten (96) (97). Auch nach längerer Kultivierung behalten diese die Fähigkeit, sich nach einer Reimplantation in murine Blastozysten in der Keimbahn anzusiedeln (98). Durch die Reimplantation genetisch veränderter ES-Zellen können somit genetisch veränderte Mauslinien erzeugt werden. Die Kultivierung von ES-Zellen erfolgte grundsätzlich auf einem Rasen embryonalen Fibroblasten (EF). Diese Ko-Kultivierung ist notwendig, da EF-Zellen

den ES-Zellen eine nicht näher definierbare Matrix (u.a. Wachstumshormone) zur Verfügung stellen, die das ES-Zellwachstum begünstigen und einer Ausdifferenzierung entgegenwirken. Zur Kultivierung wurden die EF-Zellen in EF-Medium dünn ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz bis zu vier Mal passagiert. Die Ko-Kultivierung mit ES-Zellen erfolgt nach einer Mitomycin C-Behandlung (2,5 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$) und einem dreifachen Waschschrift mit PBS. Wurden die EF-Zellen einmal mit Mitomycin C behandelt, wurden sie spätestens nach drei Tagen verworfen.

Um ein Ausdifferenzieren der ES-Zellen zu verhindern wurde das Medium täglich ausgetauscht und es wurde LIF (*leukemia inhibitory factor*) zugegeben. Undifferenzierte ES-Zellen wachsen kugelförmig mit einem glatten, glänzenden Rand, während ausdifferenzierte Zellkolonien matt und abgeflacht erscheinen und Ausläufer bilden.

Herstellung des ES-Medien-Zusatzes LIF mittels CHO-Zellen

Bei der Kultivierung von ES-Zellen bleibt deren Pluripotenz durch die Zugabe von LIF aufrechterhalten (99). Die Herstellung des LIF-Überstandes wurde von Dr. Petra Gais durchgeführt und erfolgte wie in der Dissertation von Dr. Melanie Martini beschrieben (100). CHO-Zellen werden als Expressionssystem rekombinanter Proteine eingesetzt. LIF wird von dem stabilen CHO-LIF-D-Zellklon produziert und in das Medium sekretiert (101). Die CHO-Zellen wurden in Kulturmedium (MEM, FCS [10%], L-Glutamin [2 mM], Penicillin+ Streptomycin [100 U/ml], β -Mercaptoethanol [0,05 mM]) ausgesät, welches mit dialysiertem FCS (Dialyse: 24 h gegen 2 l PBS) versetzt wurde. Nach der Expansion der Zellen wurden die Zellen 7 Tage lang in Methothrexat-haltigem Medium [2 μM] kultiviert. Durch die Zugabe von Methothrexat wird die Expressionsrate des Produktgens durch Amplifizierung erhöht. Nach der Inkubation mit Methothrexat wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^7 Zellen/15 cm-Zellkulturschale ausgesät und in Standardmedium für 24 h kultiviert. Im Anschluss wurde der LIF-haltige Überstand abgenommen, sterilfiltriert und an ES-Zellen zur Bestimmung der einzusetzenden LIF-Konzentration titriert.

Gewinnung embryonaler Fibroblasten

Die embryonalen Fibroblasten, die für die Kultivierung von ES-Zellen benötigt wurden, wurden aus superovulierten CD1 Mäusen an Tag 14 post coitum gewonnen. Nach Tötung durch zervikale Dislokation wurde den Tieren der Uterus steril entnommen und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen aus dem Uterus präpariert und in PBS gewaschen. Im

Anschluss wurde den Föten der Kopf mittels Skalpell entfernt. Vom Korpus der Embryonen wurde Herz, Leber und Lunge entfernt. Das restliche embryonale Gewebe wurde mit einem Skalpell zerteilt, durch ein Sieb gedrückt und in EF-Medium kultiviert. Pro 10 cm Kulturschale wurden etwa 5×10^6 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden alle 2 Tage mit Medium versorgt und expandiert. Nach dem Ernten der Zellen wurden diese in Kryoröhrchen aliquotiert und anschließend zuerst für 30 Min. bei -20°C und danach für 48 Stunden bei -80°C inkubiert. Die Lagerung erfolgte in flüssigen Stickstoff.

Auftauen von embryonalen Mausstammzellen

Vor dem Auftauen der ES-Zellen wurden auf eine 48 *well*- und eine 24 *well*-Zellkulturplatte vorbehandelte EF-Zellen ausgesät. Die 48 *well*-Zellkulturplatte mit den positiven Klonen wurde im Brutschrank aufgetaut und die einzelnen Klone in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, welches anschließend bei 1.200 rpm für 5 Min. zentrifugiert wurde. Das resultierende Zellpellet wurde in $100 \mu\text{l}$ ES-Medium resuspendiert und auf einer 48 *well*-Zellkulturplatte ausgesät. Wenn die ES-Zellen ausreichend dicht bewachsen waren, wurden die Zellen auf die vorbereitete, bereits mit EFs bewachsene 24 *well*-Zellkulturplatte überführt.

3.2.3.1.4 Generierung rekombinanter ES-Zellklone

Die Generierung rekombinanter ES-Zellklone erfolgte durch Integration des linearisierten Inaktivierungsvektors mittels Elektroporation. Nach anschließender Selektion wurden positive Klone mittels PCR-Screening selektiert.

Linearisierung des Inaktivierungsvektors

Zur Linearisierung des Inaktivierungsvektors wurden vier Restriktionsansätze mit je $50 \mu\text{g}$ DNA (Inaktivierungsvektor), $50 \mu\text{l}$ Puffer und $20 \mu\text{l}$ Restriktionsenzym (5.000 U/ml) zu $375 \mu\text{l}$ H_2O gegeben. Der $500 \mu\text{l}$ Ansatz wurde dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden zu diesem Ansatz $50 \mu\text{l}$ NaAc [3M] und $950 \mu\text{l}$ Ethanol [100%] gegeben. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag bei 13.000 rpm für 30 Min. bei 4°C zentrifugiert, unter der Sterilbank der Überstand abgesaugt und unter Zugabe von $500 \mu\text{l}$ Ethanol [70%] und erneuter Zentrifugation (13.000 rpm für 15 Min. bei 4°C) gewaschen. Das Pellet wurde erneut abgesaugt, getrocknet und in $150 \mu\text{l}$ PBS durch 1-2 stündige Inkubation im Wasserbad gelöst. Anschließend wurden die gepoolten Ansätze zur Elektroporation eingesetzt.

Elektroporation embryonaler Stammzellen

Für die Elektroporation wurden 5×10^7 ES-Zellen in 7 ml ES-Zellmedium aufgenommen und mit 1 ml linearisiertem Inaktivierungsvektor gemischt. Jeweils 800 μ l dieses Gemisches wurden in eine sterile Elektroporationsküvette überführt und einem elektrischen Feld von 340 mV und 250 μ F ausgesetzt. Die Zeitkonstante (τ) lag in einem Bereich von 3,6 bis 4,3. Nach der Elektroporation wurden die Küvetten 10 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde je ein Elektroporationsansatz auf zwei 10 cm Kulturschalen mit vorbehandelten EF-Zellen in ES-Medium ausgesät.

Selektion rekombinanter ES-Zellklone

Ab dem zweiten Tag nach der Elektroporation erfolgte die Selektion rekombinanter ES-Zellklone. Hierfür wurden die Zellen durch Antibiotika-Zugabe [+200 g/ml G418, +2 mg/ml Ganciclovir] einem doppelten Selektionsdruck ausgesetzt. Dadurch kam es innerhalb von 5-10 Tagen zu einem Absterben aller nicht-rekombinanten Zellen. Nach ca. 14 Tagen waren dann deutlich sichtbare, Antibiotika-resistente ES-Zellkolonien herangewachsen. Diese wurden einzeln in 96 *well*-Zellkulturplatten mit PBS überführt. Anschließend wurden die Kolonien durch Behandlung mit Trypsin/EDTA (10 Min., 37°C) vereinzelt, gut resuspendiert und auf eine frische 96 *well*-Zellkulturplatten mit 140 μ l ES-Medium überführt und mit EF-Zellen kokultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und erneute Antibiotikaselektion. Die Klone wurden sowohl auf 96 *well*- (PCR-Screening), als auch auf 48 *well*- (Back-up) Mikrotiterplatten expandiert. Die Back-up Platte wurde zur Sicherung und bis zum Vorliegen der Ergebnisse der PCR-Analyse in ES-Einfriermedium zuerst für 30 Min. bei -20°C und danach bei -80°C eingefroren.

PCR-Screening von ES-Zellklonen

Zur Detektion positiver ES-Zellklone wurden die Klone einer 96 *well*-Zellkulturplatten in einer Screening-PCR untersucht. Dazu wurden die Klone 2 x mit PBS gewaschen (1.200 rpm, 5 Min.) und dann zum Ablösen der Zellen mit 25 μ l Trypsin/EDTA für 10 Min. bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 85 μ l ES-Medium resuspendiert und auf eine V-Platte überführt, welche anschließend bei 1.200 rpm für 5 Min. zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde anschließend in 150 μ l PBS resuspendiert und erneut bei 1.200 rpm für 5 Min. zentrifugiert.

Zur DNA-Präparation der ES-Zellklone wurden die Pellets in 25 μl H_2O resuspendiert, auf eine PCR-Platte überpipettiert und gemäß Schema in Tabelle 6 weiterbehandelt.

Tabelle 6: DNA-Präparation der ES-Zellklone.

Temperatur	Zeit	Reagenz
95°C	10 Min.	+ 5 μl Proteinase K
56°C	60 Min.	
95°C	5 Min.	
4 °C		

Danach wurde das Screening per PCR durchgeführt (3.2.1.6).

3.2.3.1.5 Generierung chimärer Mäuse

Die weiteren Schritte zur Generierung chimärer Mäuse durch Blastozysteninjektion wurden von Dr. Michael Bösl am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried durchgeführt.

Superovulation

Zur Gewinnung einer großen Anzahl von Embryonen im Blastozystenstadium wurden weibliche C57BL/6-Mäuse superovuliert. Dazu wurde den Mäusen 10 U PMSG (*Pregnant Mare's Serum Gonadotropin*) und in einem Abstand von ca. 48 h 10 U hCG (*human Chorionic Gonadotropin*) intraperitoneal injiziert und im Anschluss daran mit männlichen C57BL/6-Mäusen verpaart. Für die Blastozysteninjektion wurden die Embryonen am Tag 3,5 entnommen.

Blastozysteninjektion

An Tag 3,5 post coitum wurden superovulierende C57BL/6 Weibchen durch zervikale Dislokation getötet, die Uteri isoliert und die Blastozysten retrograd ausgespült. Mittels Mikromanipulatoren wurden ca. 20 der homolog rekombinierten 129/Sv ES-Zellen in das Blastozoel injiziert. Bei der anschließenden Blastozysteninjektion wurden bis zu 10 Blastozysten pro Uterushorn in den Uterus pseudoschwangerer Ammenmütter eingesetzt. Wenn die Nachkommen dieser Tiere eine mosaikartige gelb-schwarze Fellfarbe zeigten, wurden diese Tiere mit C57BL/6-Mäusen verpaart. Resultierten aus dieser Verpaarung braunfar-

bige Mäuse, so wurden diese auf Keimbahntransmission getestet und bei positivem Ergebnis in den optimierten Hygienebereich des Zentrums für Präklinische Forschung am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München überführt, wo die weitere Züchtung der Tiere erfolgte.

3.2.3.1.6 Transfektion von Hek293 Zellen mittels Calcium-Phosphat

Bei dieser Art der Transfektion wird die DNA in Form feinkörniger Calcium-Phosphat-Präzipitate auf die Zelle gebracht. Die Kristalle werden bei der Transfektion durch Endocytose aufgenommen. Eine hohe Reinheit der DNA ist dabei sehr wichtig, da sonst keine Präzipitate gebildet werden. Am Vorabend der Transfektion wurden die Zellen in DMEM-Medium ausgesät. Die Zellen sollten sich bei der Transfektion im exponentiellen Wachstum befinden. Die Transfektion erfolgte dann nach dem aufgeführten Pipettierschema (Tabelle 7).

Tabelle 7: Pipettierschema der Calcium-Phosphat-Transfektion.

Zellzahl	5x10 ⁴	2x10 ⁵	1x10 ⁶	3x10 ⁶
Zellkulturplatten	3 cm	6 cm	10 cm	15 cm
DNA [1 µg/µl]	4 µl	8 µl	16 µl	48 µl
CaCl ₂ [2,5 M]	10 µl	15 µl	40 µl	120 µl
ddH ₂ O	86 µl	127 µl	344 µl	1032 µl
BES	100 µl	150 µl	400 µl	1200 µl
Gesamtvolumen Medium	2 ml	2,5 ml	8 ml	25 ml

Bei der Durchführung der Transfektion wurde darauf geachtet, dass die Zugabe von BES final, tropfenweise und während konstantem Vortexen erfolgte. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz tropfenweise unter sanftem Schwenken der Schale auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Der Transfektionsstopp erfolgte am darauffolgenden Tag durch Medienwechsel. Die Zellen wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 7% CO₂ weiterkultiviert.

3.2.3.1.7 Transfektion von Hek293 Zellen mittels Fugene[®] HD Transfection

Reagent

Die Durchführung der Fugene[®] HD Transfektion erfolgte nach aufgeführten Pipettierschema (Tabelle 8). Die am Vortag ausgesäten Zellen sollten bei der Transfektion circa 80% kon-

fluent sein. Die in Opti-MEM I gelöste DNA wurde in ein steriles Rundbodenröhrchen pipettiert. Zu diesem Ansatz wurde dann FuGENE® HD Transfection Reagent gegeben, durch kurzes vortexen gemischt und anschließend 15 Min. bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben und bei 37°C über Nacht im Brutschrank kultiviert.

Tabelle 8: Pipettierschema der FuGENE® HD Transfektion.

Zellzahl	1×10^5 - $7,5 \times 10^5$	2×10^5 - 1×10^6	2×10^5 - 1×10^6	$1,5 \times 10^6$ - 5×10^6
Zellkulturplatten	12 well	6 well	35 mm	10 cm
DNA gelöst in Opti-MEM I [0,02 µg /ml]	50 µl [1 µg DNA]	100 µl [2 µg DNA]	100 µl [2 µg DNA]	500 µl [10 µg DNA]
FuGENE® HD Transfection Reagent	4 µl	8 µl	8 µl	40 µl
Gesamtvolumen Medium	1 ml	2 ml	2 ml	10 ml

3.2.3.1.8 jetPEI™ Transfektion

Am Vorabend der Transfektion wurden die Zellen ausgesät. Die Zellen sollen bei Transfektion circa 50 - 70% konfluent sein. Am Tag der Transfektion wurde morgens das Medium gewechselt. Bei der Transfektion wurde gemäß dem Schema in Tabelle 9 vorgegangen. In einem sterilen Rundbodenröhrchen wurden 3 µg DNA mit NaCl [150 mM] verdünnt und anschließend kurz gevortext. Es wurden in einen neuen Reaktionsgefäß jetPEI™ mit NaCl [150 mM] verdünnt und dieser Ansatz auf einmal zur DNA zugeben und kurz gevortext. Dieser Ansatz wurde 30 Min. bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 2 Stunden wird nochmals Medium zugegeben. Die Zellen wurden dann für 24 bis 48 Stunden inkubiert.

Tabelle 9: Pipettierschema der jetPEI™ Transfektion.

Zellzahl	1×10^5 - 2×10^5	2×10^5 - 5×10^5	5×10^5 - 1×10^6	3×10^6 - 6×10^6
Zellkulturplatten	24 well	12 well	35 mm	10 cm
DNA	1-2 µg	2-4 µg	6-12 µg	30-60 µg
jetPEI™	2-4 µl	4-8 µl	8-14 µl	60-120 µl
DNA gelöst in NaCl	50 µl	50 µl	100 µl	500 µl
jetPEI™ gelöst in NaCl	50 µl	50 µl	100 µl	500 µl
Gesamtvolumen Medium	0,5 ml+0,5 ml	1 ml+1 ml	2 ml+2 ml	10 ml+5 ml

3.2.3.1.9 Makrophagentransfektion mittels jetPEI™-Macrophage

Bei jetPEI™-Macrophage handelt es sich um ein Mannose konjugiertes lineares Polyethylenimin (PEI)-Derivat, das speziell für die Transfektion von Zellen mit Mannose-spezifischen Membranrezeptoren entwickelt wurde. Die chemische Kopplung an den Mannose-Liganden ermöglicht eine spezifische Interaktion, welche eine Internalisierung der Komplexe durch Endozytose auslöst. Innerhalb des Endosoms agieren diese dann als Protonenschwamm, puffern den pH und schützen dadurch die DNA vor der Degradierung. Der kontinuierliche Protonen-Influx induziert das osmotische Anschwellen des Endosoms und ermöglicht dadurch den Austritt der DNA ins Zytoplasma.

Zur Transfektion wurden 4×10^5 RAW 264 Makrophagen in einer 35 mm Schale mit 2 ml RPMI-Medium (10%) ausgesät. Am nächsten Tag wurde bei einer 40-50% Konfluenz der Zellen die Transfektion durchgeführt. Dazu wurden 6 μg DNA mit 100 μl NaCl verdünnt (Ansatz 1) und durch vortexen gemischt. In einen zweiten Ansatz wurden 19,2 μl jetPEI™-Macrophage-Lösung mit 100 μl NaCl verdünnt, durch vortexen gemischt und zu Ansatz 1 pipettiert und erneut durch kurzes vortexen gemischt. Dieser Ansatz wurde 30 Min. bei RT inkubiert und auf die Zellen gegeben.

3.2.3.1.10 Makrophagentransfektion mittels Elektroporation

RAW 264 Makrophagen einer dicht bewachsenen 15 cm Schale wurden abgespült und in der Zentrifuge bei 1.500 rpm für 3 Min. pelletiert. Zum Waschen wurde das Pellet in Medium resuspendiert und erneut bei 1.500 rpm für 3 Min zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS aufgenommen und auf 4×10^6 Zellen pro Ansatz eingestellt, erneut zentrifugiert (1.500 rpm, 3 Min.) und anschließend in 100 μl Opti-MEM I aufgenommen. Zur Transfektion wurden 10 μg DNA direkt in die Küvette pipettiert und die 100 μl in Opti-MEM I gelöste Zellsuspension dazugegeben. Der Ansatz wurde für 3 Min. bei RT inkubiert. Die Durchführung der Elektroporation erfolgte bei $\mu\text{F}3 / 1000 \text{ V} / 2 \text{ pulses}$. Nach der Elektroporation wurde der Ansatz sofort in RPMI-Medium (10%) aufgenommen und bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

3.2.3.1.11 Herstellung einer stabilen Makrophagenzelllinie

Die Herstellung einer stabilen RAW 264 Makrophagenzelllinie erfolgte indem am ersten Tag nach der Transfektion die Zellen mit G418 [1 mg/ml] selektioniert wurden. Sobald nach ca. 8 Tagen erste Klone sichtbar waren, wurden diese unter dem Binokular gepickt und in eine

48 *well* Platte mit 1 ml Medium und G418 [1 mg/ml] überführt. Die einzelnen Klone wurden dann weiterkultiviert.

3.2.3.1.12 Verschiedene Stimulationsansätze für Makrophagen

Makrophagenstimulation für ELISA

Zur Stimulation von Makrophagen der Zelllinie RAW 264 wurden je Ansatz 1×10^5 Zellen in ein *well* einer 96 *well*-Zellkulturplatte mit 200 μ l RPMI Medium ausgesät. Nach einer Ruhezeit von 6 Stunden wurden die Zellen stimuliert. Nach Stimulation der Zellen wurde die 96 *well*-Zellkulturplatte bei 1.500 rpm für 3 Min. zentrifugiert und der Überstand entweder sofort im ELISA eingesetzt oder auf eine 96 *well*-Zellkulturplatte überpipettiert und bis zum Tag der Messung bei -80°C eingefroren.

Stimulation von Knochenmarks-Makrophagen für ELISA

Zur Stimulation knochenmarksgenerierter Makrophagen wurden 2×10^5 Zellen in eine 96 *well*-Flachbodenzellschale mit 200 μ l Makrophagenmedium (10%) ausgesät. Nach Stimulation der Zellen (Doppelansätze) wurde die 96 *well*-Zellkulturplatte bei 1.500 rpm für 3 Min. zentrifugiert und der Überstand entweder sofort im ELISA eingesetzt oder in eine neue 96 *well*-Zellkulturplatte überpipettiert und bis zum Tag der Messung bei -80°C eingefroren.

Stimulation von Knochenmarks-Makrophagen zur RNA-Gewinnung

Es wurden je 5×10^6 Zellen in eine 6 cm Schale mit 5 ml Makrophagenmedium (3%) ausgesät. Die Zellen wurden nach einer 3 stündigen Ruhephase stimuliert. Nach Beenden der Stimulationszeit wurden die Zellen mit dem Zellschaber abgenommen und im 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß zentrifugiert (1.500 rpm, 4 Min., 4°C). Anschließend wurden die Zellen 2x mit kaltem PBS gewaschen (2.800 rpm, 4 Min., 4°C). Das Zellpellet wurde in 350 μ l RLT-Puffer aufgenommen und bei -80°C gelagert.

Stimulation von RAW 264 Makrophagen für Western Blot

Zur Stimulation von RAW Makrophagen wurden 1×10^6 Zellen pro Ansatz in eine 6 well-Zellkulturplatte in 2 ml Medium (3%) abends ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Stimulation erfolgte am darauffolgenden Tag.

3.2.4 Immunologischen Methoden

3.2.4.1 Western Blot (Immunoblot)

Ziel des *Western Blotting* ist der Transfer zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine Membran und deren anschließender immunchemischen Visualisierung mittels Chemilumineszenz. Die mittels SDS-PAGE (3.2.5.3) aufgetrennten Proteine wurden nach der modifizierten Methode von H. Towbin (102) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, an welche sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen binden. Dazu wurde zuerst das Sammelgel sowie zur Orientierung eine Ecke des Trenngels entfernt. Der Transfer wurde in einer *Semi-dry* Elektrophorese-Apparatur bei 2 mA/cm^2 Membranfläche für 60 Min. (103) durchgeführt. Dazu wurde das Gel blasenfrei auf die Membran gelegt und beides zusammen zwischen jeweils zwei mit Transferpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere gestapelt. Um die Transfereffizienz zu überprüfen, wurde die Membran reversibel mit Ponceau S gefärbt (104).

Bei der anschließenden Immundetektion wurden spezifische Proteinbanden auf der Membran sichtbar gemacht. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1 Stunde (Schüttler, RT) in 5%-igem Milchpulver (w/v)/TBST inkubiert. Daran anschließend erfolgte der proteinspezifische Nachweis durch Antikörper. Der proteinspezifische Erstantikörper wurde in einer den Herstellerangaben entsprechenden Verdünnung in 5% Milchpulver/TBST bzw. 5% BSA (w/v)/TBST eingesetzt und die Membran in dieser Lösung über Nacht (4°C) inkubiert. Nach einem 3x Waschschrift mit TBST für 10 Min. bei RT wurde ein Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in 5%-igem Milchpulver/TBST bzw. 5% BSA/TBST verdünnt und zusammen mit der Membran für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach dem darauffolgenden Waschschrift mit TBST (3 x bei RT) erfolgte die Detektion der spezifischen Proteinbande mit Hilfe des ECL-Detektionsreagenz, dem Substrat für die Peroxidase, die durch Umsetzung von Wasserstoffperoxid Sauerstoff freisetzt und so die Oxidation von Luminol im alkalischen Milieu katalysiert. Das Luminol wird in ein höheres Energieniveau transferiert. Beim Rückfall in den Grundzustand wird diese Energie als Chemilumineszenz frei. Dafür wurden die

Detektionslösungen (ECL Reagenzen 1 und 2) zu gleichen Teilen gemischt und zwischen einer Klarsichtfolie auf die Membran aufgetragen.

Die Detektion des Chemilumineszenzsignals erfolgte in einer Dunkelkammer mit Hilfe eines Röntgenfilms. Um unterschiedliche Proteine auf ein und demselben Blot nachzuweisen wurde der Blot „gestrippt“ und rehybridisiert. Hierfür wurde die Membran kurz in TBST gewaschen und dann für 20 Min. in Strip-Lösung auf dem Taumler inkubiert. Nachdem unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation (3x) bei RT für jeweils 10 Min. mit 5%-igem Milchpulver/TBST abgesättigt wurden, konnte eine erneute Bindung eines Primärantikörpers durchgeführt werden.

3.2.4.2 FACS-Analyse

Zur FACS-Analyse wurden routinemäßig 5×10^5 Zellen pro Färbung eingesetzt. Die Zellzahleinstellung erfolgte in FACS-Puffer. Nach Zentrifugation bei 1.500 rpm für 3 Min. wurde das Pellet in FC-Block (CD16/32) (1:100 in PBS/FACS-Puffer) resuspendiert und 15 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen einmalig in 200 μ l FACS-Puffer durch Zentrifugation bei 1.500 rpm für 3 Min. gewaschen und das Pellet in 200 μ l FACS-Puffer aufgenommen. Zu dem Ansatz wurden dann in einem Schritt 1 μ l primärer Antikörper und 1 μ l sekundärer Antikörper zugegeben. Dieser Ansatz wurde dann für 20 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen einmalig mit dem FACS-Puffer durch Zentrifugation bei 1500 rpm für 3 Min. gewaschen und zur FACS-Analyse in 300 μ l FACS-Puffer resuspendiert eingesetzt.

3.2.4.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels ELISA

Der *Enzyme-linked immunosorbent-assay* (ELISA) ist eine quantitative analytische Methode bei der ein enzymatisch markierter Reaktionspartner als Marker für den Substratumsatz dient mithilfe dessen auf die Konzentration des gesuchten Proteins geschlossen werden kann. Dabei ist eine Komponente, entweder der Antikörper oder das Antigen an einer festen Phase adsorbiert.

3.2.4.3.1 Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in Zellüberständen

Bei den Quantikine[®] ELISA Kits von R&D ist ein affinitätsgereinigter polyklonaler Antikörper spezifisch für den Nachweis des zu untersuchenden Zytokines auf einer Mikrotiterplatte gebunden. Standards, Kontrollen und Proben werden in die einzelnen *wells* pipettiert und das darin enthaltene Antigen wird vom Antikörper gebunden. Nachdem alle ungebundenen Substanzen gewaschen sind, wird ein Enzym gekoppelter, polyklonaler Maus-Zytokin-spezifischer Antikörper in die *wells* pipettiert. Ungebundenes Antikörper-Enzym Reagenz wird durch waschen entfernt. Anschließend wird eine Substratlösung dazugegeben. Die Enzymreaktion ergibt ein blaues Produkt, das bei Zugabe der Stopplösung einen Farbumschlag nach Gelb macht. Die gemessene Farbintensität steht im proportionalen Verhältnis zum gebundenen Zytokin. Die Probenkonzentrationen werden im Verhältnis zur Standardkurve bestimmt. Die Durchführung der ELISAs erfolgte nach Protokoll und unter Verwendung der Komponenten des jeweiligen Kits.

3.2.4.3.2 Bestimmung von Serum-Immunglobulinkonzentrationen

Die Bestimmung der Konzentration der Serum-Immunglobuline IgM, IgG1, IgG2b erfolgte durch Verwendung des jeweiligen Kits der Firma Bethyl Laboratories, Montgomery, USA.

Herstellung der Puffer (Coating Buffer, Wash Buffer, Blocking solution, Sample/Conjugate Diluent, Enzyme Substrate und Stop Solution) und Durchführung des ELISA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.2.5 Proteinbiochemische Methoden

3.2.5.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen (RIPA-Lyse)

Bei der RIPA-Lyse wurden die Zellen mit dem Zellschaber abgenommen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation bei 2.800 rpm für 4 Min. pelletiert. Die Pellets wurden in PBS mittels Zentrifugation (2.800 rpm, 4 Min., 4°C) gewaschen und anschließend das Pellet in 50 µl RIPA-Puffer [+ Inhibitoren] gelöst und 10 Min. bei 4°C im Drehrad inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 15 Min. bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Zu dem Überstand wurde dann 25 µl 3x SDS-Puffer gegeben. Die Probe wurde für 5 Min. bei 94°C aufgekocht und danach entweder direkt für eine SDS-PAGE (3.2.5.3) eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

3.2.5.2 Luciferaseassay

Beim Luciferase-Testsystem wird die potentielle Promoter-Sequenz eines Genes, dessen Genprodukt das Target des Screening darstellt, vor das Luciferase-Gen kloniert. Da der Promoter zunächst aktiviert werden muss, stellt er einen selektiven Indikator für Agonisten des natürlichen Aktivators dar. Durch die Kopplung mit dem Luciferase-Gen wird nach der Aktivierung des Target-Gen-Promoters Luciferase hergestellt, woraufhin dem Testsystem zugegebenes Luciferin unter Chemilumineszenz zu Oxyluciferin reagiert.

Bei der Durchführung eines Luciferase-Assays wurden die Zellen mittels Calcium-Phosphat (3.2.3.1.6) oder mittels Fugene[®] HD Transfection Reagent (3.2.3.1.7) transfiziert. Zur Untersuchung der jeweiligen Transfektionseffizienz wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Ansätze mit je 1 μg GFP-Vektor co-transfiziert. Nach der Stimulation wurden die Zellen durch Abspülen mit der Pipette abgelöst und 800 μl zur FACS Analyse (GFP-Kontrolle) (3.2.4.2) eingesetzt. Der Rest wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben und bei 1.500 rpm für 4 Min. zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 2.800 rpm für 4 Min. pelletiert. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte mithilfe des Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Kits von Promega mit den im Kit bereitgestellten Puffern und Substraten nach Angaben des Herstellers. Zur Lyse der Zellen wurde das Pellet in 200 μl Passive Lysis Buffer resuspendiert. Nach 20 Min. Inkubation auf dem Schüttler wurde der Ansatz mindestens 2 Stunden bei -80°C gelagert. Für die Messung wurden 50 μl des Zellysats bei RT eingesetzt. Die Messung erfolgte am Mithras LB940.

3.2.5.3 SDS-PAGE

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch Zugabe von Natrium-Dodecylsulfat (SDS) erhalten alle Proteine eine negative Ladung, durch Zugabe von β -Mercaptoethanol lösen sich die internen Disulfidbrücken und es kommt zu einer Linearisierung der Proteine. Durch Verlust von Ladung und Form erfolgt die Proteinauftrennung im elektrischen Feld anhand des Molekulargewichts. Die scharfe Auftrennung der Proteine setzt jedoch deren Fokussierung voraus. Um Proteine aus Probenvolumina von 10 – 50 μl in scharfe Banden auftrennen zu können, führte Laemmli 1970 (105) die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese ein, bei der zwischen einem Sammel- und einem Trenngel unterschieden wird (Zusammensetzung siehe Tabelle 10). Das Sammelgel hat die Aufgabe, die Proteine an der Front zum Laufgel zu

konzentrieren. Die Auftrennung nach dem Molekulargewicht erfolgt dann im kleinporigen Trenngel.

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurde zuerst zwischen zwei abgedichteten Glasplatten, welche durch einen Abstandshalter voneinander getrennt werden, das Trenngel gegossen. Für ein Gel wurden 5 ml Trenngel benötigt. Das frisch gegossene Gel wurde bis zur vollständigen Polymerisierung mit H₂O überlagert. Danach wurde das Wasser abgegossen und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet, wobei in das noch flüssige Sammelgel der Probenkamm eingesetzt wurde. Es wurden 2 ml Sammelgel pro Gel benötigt. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren des Geles wird die Abdichtung der Kammer und der Probenkamm entfernt und die Platten werden in die mit SDS-Laufpuffer befüllte Elektrophoresekammer eingespannt.

Tabelle 10: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele.

Lösungen	%	Trenngel				Sammelgel
		7,5	10	12,5	15	
Proteingröße	kDa	100-200	50-150	40-70	10-50	
Volumen	ml	20	20	20	20	10
ddH ₂ O	ml	9,7	8,0	6,4	4,7	6,4
30% Acrylamid/Bisacrylamid	ml	5	6,7	8,3	10	1,0
1,5 M Tris, pH 8.8	ml	5	5	5	5	
0,5 M Tris, pH 6.8	ml					2,4
10% SDS	μl	230	230	230	230	100
10% APS	μl	120	120	120	120	200
TEMED	μl	11,4	11,4	11,4	11,4	5

Die Konzentration an Acrylamid ist entscheidend für die Porengröße der Gelmatrix und wird entsprechend der Größe der aufzutrennenden Proteine variiert. Da durch Zugabe des Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) sowie des Polymerisierungskatalysator Tetramethylethylendiamin (TEMED) die Polymerisation gestartet wird, werden diese zum Schluss dazugegeben.

Vor dem Auftragen der Proben wurden diese für 5 Min. bei 95°C aufgeköcht. Als Marker wurde 6 μl PageRuler™ Prestained Protein Ladder eingesetzt. Der Gellauf erfolgte bis zum Erreichen des Trenngel bei 80 V und danach bei 120 V.

3.2.6 Tierexperimentelle Methoden

3.2.6.1 Organentnahme bei Mäusen

Die Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden die für den jeweiligen Versuch benötigten Organe mit einem semi-sterilem (Desinfektion mit 70%-igem Ethanol) Operationsbesteck entnommen.

3.2.6.1.1 Gewinnung von Zellen aus Milz und Thymus

Die Milz bzw. der Thymus wurden explantiert und als ganzes Organ nach Zugabe von 10 ml PBS in einem Homogenisator durch mehrmaliges Auf- und Abbewegen des Stempels (*down-
cen*) homogenisiert. Die resultierende Zellsuspension wurde dann in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugieren bei 18°C, 1.500 rpm und 4 Min. pelletiert, die Erythrozyten lysiert (3.2.6.3) und der Ansatz schließlich gefiltert (*Cell Strainer*). Nach dem Zählen der Zellen und dem Einstellen auf die gewünschte Zellzahl wurden diese sofort im Versuch eingesetzt.

3.2.6.1.2 Isolierung von Knochenmarkszellen

Um knochenmarksgenerierte Makrophagen aus Knochenmarkszellen zu generieren wurde den Mäusen Femur und Tibia entnommen, von umliegendem Muskel- und Fettgewebe befreit, in Ethanol [70%] gereinigt und in eine 6 cm Zellkulturschale mit PBS gegeben. Anschließend wurden die Epiphysen von Femur und Tibia mit einer Schere abgetrennt und die medialen Röhrenknochenstücke mit PBS (10 ml-Spritze, 27G-Kanüle) durchspült. Das so gewonnene Knochenmark wurde bei RT für 4 Min. bei 1.500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 10 ml PBS resuspendiert und dieser Ansatz gefiltert (*Cell Strainer*). Die Zellen wurden erneut bei RT für 4 Min. bei 1.500 rpm zentrifugiert, das Pellet in je nach generierendem Zelltyp entsprechendem Medium resuspendiert und auf einer Schale bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

3.2.6.1.3 Generierung von Knochenmarks-Makrophagen

Zur Generierung von Knochenmarks-Makrophagen wurden die in 3.2.6.1.2 isolierten Zellen in 10 ml Makrophagenmedium auf einer Petrischale kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen gezählt und auf 5×10^6 Zellen pro Petrischale in 10 ml Makrophagenmedium ausgesät. Nach 3 Tagen wurden 5 ml frisches Medium zugegeben. Am darauffolgenden Tag erneut 2 ml. Nach insgesamt 6 Tagen wurden die Zellen mit 1 ml Biotase (5 Min., 37°C)

abgelöst und 1x PBS gewaschen (18 °C, 1.500 rpm, 4 Min.) und danach je nach Versuch weiterverwendet.

3.2.6.2 Thioglykollat-Injektion und Peritoneallavage

Zur Gewinnung von Peritoneal-Makrophagen wurde den Mäusen i.p. 1 ml Thioglykolat injiziert. Dadurch wird die Migration von Makrophagen in das Peritoneum induziert. Nach 5 Tagen erfolgte dann die Peritoneallavage. Dabei wurde mit 10 ml PBS in einer Spritze (19G-Kanüle) die Peritonealhöhle gründlich gespült. Die so gewonnene Zellsuspension wurde bei 1.500 rpm für 4 Min. zentrifugiert. Falls im Zellpellet sehr viele Erythrozyten zu sehen waren, wurde eine Erythrozytenlyse (3.2.6.3) durchgeführt. Anschließend wurde ein Teil der Zellen zur Bestimmung des Anteils an Peritoneal-Makrophagen zur FACS Analyse eingesetzt (CD11b/F480). Der Rest der Zellen wurde in RPMI-Medium aufgenommen und konnte für Stimulationsexperimente eingesetzt werden.

3.2.6.3 Erythrozytenlyse

Falls im Zellpellet isolierter Mausgewebe sehr viele Erythrozyten zu sehen waren, wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Dabei wurde zur Lyse der Erythrozyten das Zellpellet in 3 ml Ammoniumchlorid resuspendiert und für 3 - 4 Min. auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Zellen 2 x PBS gewaschen (18 °C, 1.500 rpm, 4 Min.).

3.2.6.4 Serumgewinnung

Zur Serumgewinnung wurde narkotisierten Mäusen über die Augenvene peripheres Blut entnommen. Das Vollblut wurde in Serumröhrchen aufgefangen. Anschließend wurden die Serumröhrchen bei 10.500 rpm für 2 Min. bei RT zentrifugiert. Danach konnte die Serum-schicht abgenommen werden. Das Serum wurde bei -80°C gelagert.

3.2.6.5 Untersuchung im Sepsismodell

Das Operationsverfahren der *Colon ascendens stent peritonitis* (CASP) in der Maus wurde wie in der Dissertation von Dr. Georg Weber beschrieben durchgeführt (106). Vor Beginn der Operation wurde in das Plastikröhrchen eines 16-Gauche Venenkatheters (Venflon®, Helsingborg, Schweden) ca. 3 mm von dessen Öffnung entfernt eine Kerbe geritzt. Unter Narkose wurde das Abdomen im Bereich der Linea alba geöffnet, das Colon ascendens eventeriert, ein 7/0 Ethilon-Faden (Ethicon, Norderstedt) ca. 10 mm von der Ileocoecalklappe entfernt, durch den antimesenterialen Teil des Colon ascendens gezogen und verknötet. Der

vorbereitete Venenkatheter wurde direkt daneben durch die Colonwand in das Intestinallumen eingeführt und mit dem Faden an der Einkerbung fixiert. An der gegenüberliegenden Darmwand wurde der Katheter durch einen zweiten Knoten, wiederum antimesenterial gelegen, fixiert. Danach wurde die innere Katheternadel entfernt und das Plastikröhrchen kurz oberhalb der Einkerbung abgeschnitten. Zum Nachweis der korrekten intraluminalen Lage des Katheters wurde Stuhl durch dessen Öffnung gedrückt, bis ein Tropfen davon an der Katheteröffnung zu sehen war. Anschließend wurde der Darm in die Peritonealhöhle reponiert und zur Rehydrierung der Maus 0,5 ml NaCl-Lösung [0,9%] in die Peritonealhöhle injiziert. Danach wurde die Bauchhöhle in fortlaufender Naht mit einem 5/0 Ethilon-Faden geschlossen. Die Hautnaht erfolgte mit einem 3/0 Ethilon-Faden mittels Einzelknopfnah. Die Operationen im Rahmen dieser Arbeit wurden von Dr. Norbert Hüser durchgeführt.

3.3 Statistische Auswertungsverfahren

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels Student's t-Test für gepaarte Daten (GraphPad InStat 3). Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SD aufgeführt. Unterschiede werden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0,05$, d.h. wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Aussage unter 5% liegt.

4 Ergebnisse

4.1 Die Expression der Phosphatase DUSP5 in Immunzellen

4.1.1 Die Expression von DUSP5 in Immunzellen kann induziert werden

DUSP5 wird in allen Immunzellen exprimiert (38). In qRT-PCR Experimenten konnte außerdem die Induzierbarkeit der DUSP5-Expression in Immunzellen gezeigt werden. So ist in dendritischen Zellen (DCs) nach TLR2-Aktivierung mittels Pam₃Cys ein Anstieg der DUSP5-mRNA über einen Zeitraum von mindestens drei Stunden, mit einem Peak um das fünf- bis siebenfache nach einer Stunde, zu beobachten (persönliche Mitteilung Prof. B. Holzmann). Aber auch bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten polymikrobiellen Infektion wie sie im Sepsismodell (CASP) gegeben ist, zeigen Mäuse in Leber, Milz und Lunge eine erhöhte *dusp5*-Transkription (Abbildung 6). Die stärkste Induktion tritt dabei in der Milz auf, wo bereits nach drei Stunden ein starker Anstieg (~5 fach), der über zwölf Stunden konstant anhält, beobachtet werden kann. Dagegen hat sich die *dusp5*-Transkription in der Lunge nach einem Anstieg mit einem Peak (~3 fach) bei sechs Stunden nach zwölf Stunden bereits wieder normalisiert. In der Leber kann erst nach sechs Stunden ein schwacher, anhaltender Anstieg der *dusp5*-Transkription beobachtet werden. In den mesenterialen Lymphknoten ist keine veränderte *dusp5*-Transkription nachweisbar.

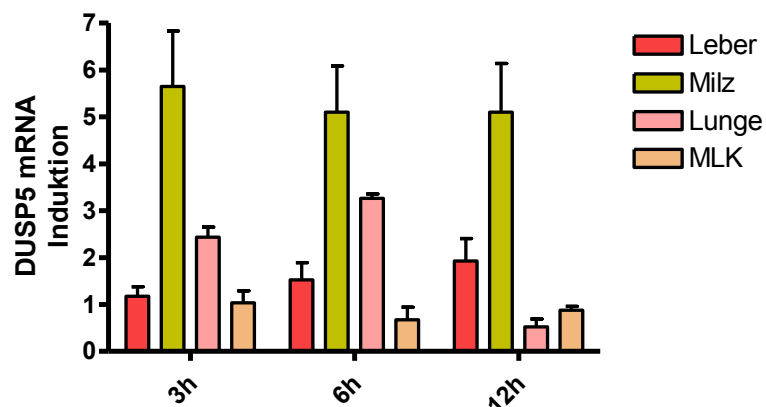


Abbildung 6: Im Sepsismodell (CASP) zeigen WT-Mäuse in Leber, Milz und Lunge, nicht jedoch in den mesenterialen Lymphknoten (MLK) eine erhöhte DUSP5-Transkription. Quantitative RT-PCR der DUSP5-Transkription in C57BL/6 Mäusen. Bei den Mäusen wurde eine CASP-OP durchgeführt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der OP wurden die Tiere getötet und aus den explantierten Organen RNA isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und in der qRT-PCR eingesetzt. Die Transkription der DUSP5-mRNA ist im Verhältnis zur β -Aktin-mRNA dargestellt. Als Referenz diente die DUSP5-Transkription bei nicht operierten C57BL/6 Mäusen. (n=4)

4.1.2 TLR2-Stimulation und CGRP induzieren den DUSP5-Promoter

Bei Entzündungsreaktionen stimulieren Immunzellen die Synthese des Neuropeptids CGRP (*Calcitonin gene-related peptide*). Da bei knochenmarksgenerierten DCs die Inkubation mit CGRP bei gleichzeitiger TLR-Aktivierung massiv die Produktion von TNF α unterdrückt, wird eine negativ immunregulatorische Funktion von CGRP diskutiert (31). Der CGRP-Effekt wird dabei vorrangig durch cAMP vermittelt. Außerdem steigert CGRP die Expression von DUSP5 hochsignifikant. Daher stellt sich die Frage, ob CGRP durch Induktion von DUSP5 immunregulatorisch wirkt. Um die regulatorischen Bereiche des DUSP5-Promoters zu bestimmen, wurde dieser zunächst auf mögliche Transkriptionsfaktor-Bindestellen für Zielgene des TLR-Signalweges und der CGRP-Aktivierung untersucht. Es sollte untersucht werden, inwieweit die so gefundenen putativen Bindestellen eine Induktion der DUSP5-Genexpression vermitteln. Dazu wurden mittels PCR drei unterschiedlich lange DNA-Sequenzen (Abbildung 7) der Promoterregion generiert und in den Luciferase-Expressionsvektor pGL3-Promoter kloniert.

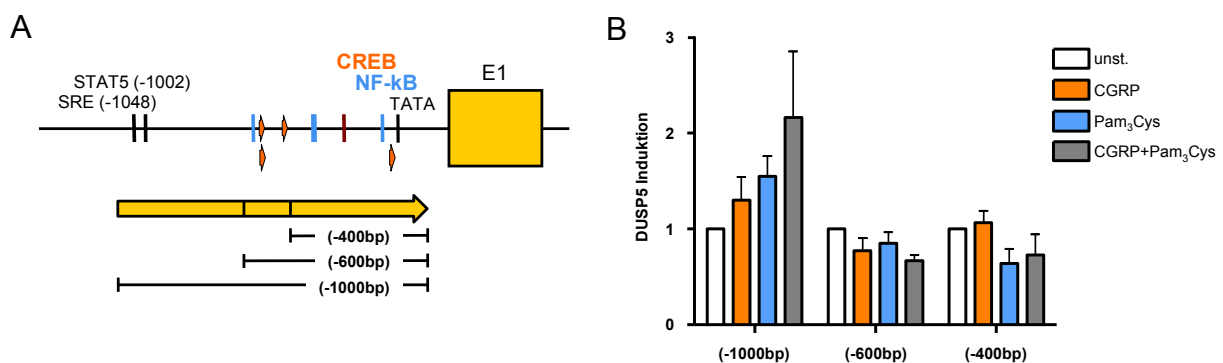


Abbildung 7: Der DUSP5-Promoter kann durch Pam₃Cys und CGRP induziert werden. (A) Dargestellt sind die möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen und die daraus abgeleiteten mittels PCR amplifizierten Promoterfragmente (-1000 bp), (-600 bp) bzw. (-400 bp). Der Promoterbereich besitzt neben STAT5 und SRE je vier putative CRE- und NF-κB-Bindestellen. (B) Luciferase-Assay der Promoteraktivität der Promoterfragmente (-1000 bp) (n=9) bzw. (-600 bp) (n=5) und (-400 bp) (n=7) nach CGRP- und/oder Pam₃Cys-Stimulation. STAT5, Signal Transducers and Activators of Transcription 5; SRE, Serum Response Element; CREB, cAMP Response Element-Binding protein.

Nachfolgend befinden sich im Vektor ein SV40-Promoter und ein Luciferase-Reportergen. Die Promoteraktivität kann damit indirekt über die Biolumineszenz des Luciferaseenzym bestimmt werden. Die erste DNA-Sequenz umfasst einen Bereich von 1000bp *upstream* (-1000bp) von Exon1 und enthält je vier Konsensussequenzen für NF-κB- und CRE-bindende Transkriptionsfaktoren (CRE [*cAMP responsive element*]) und damit potentielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen des TLR2-Signalweges (vermittelt durch NF-κB) und der

CGRP-Aktivierung (vermittelt durch cAMP). Die zweite DNA-Sequenz umfasst einen Bereich von 600bp *upstream* (-600bp) von Exon1, enthält aber trotzdem noch alle NF- κ B- und CRE-Elemente; während die dritte DNA-Sequenz (-400bp) 400bp *upstream* von Exon1 enthält und damit nur drei NF κ B- und ein CRE-Element. Nach Vektorintegration wurden die Promoterfragmente mittels Calcium-Phosphat- bzw. Fugene[®] HD-Transfektion jeweils transient in HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) Zellen exprimiert. Die transfizierten Zellen wurden anschließend über Nacht mit TLR2-Ligand (Pam₃Cys) und/oder CGRP aktiviert. In Luciferase-Assays wurde dann die *dusp5*-Promoteraktivität untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass durch TLR2- und CGRP-Aktivierung der DUSP5-Promoter induziert wird. Diese Induktion ist jedoch schwach und nur beim (-1000bp)-Fragment zu beobachten, obwohl auch im verkürzten (-600bp)-Fragment noch alle NF- κ B- und CRE-Elemente vorhanden sind (Abbildung 7). Ein additiver Effekt bei gleichzeitiger Stimulation mit Pam₃Cys und CGRP konnte nicht beobachtet werden. Der Nachweis der Induzierbarkeit des DUSP5-Promoters durch CGRP- bzw. TLR2-Aktivierung wirft die Frage auf, welche Auswirkungen die verstärkte DUSP5-Genexpression auf die weiteren Signalwege hat. Um diese Frage zu untersuchen, wurde eine DUSP5-überexprimierende Makrophagenzelllinie generiert.

4.1.3 DUSP5 reguliert die Zytokinproduktion nach TLR2-Stimulation

4.1.3.1 DUSP5-überexprimierende Makrophagen zeigen nach TLR-Stimulation eine erhöhte Zytokinproduktion

Makrophagen lassen sich durch den TLR-Signalweg aktivieren und gehören als Hauptproduzenten von Zytokinen zu den zentralen Initiatoren der Immunantwort. Daher sind diese Zellen besonders geeignet die Auswirkungen der TLR-vermittelten DUSP5-Expression zu untersuchen. Der Ansatz einer überexprimierenden Zelllinie wurde gewählt, da DUSP5 in Makrophagen nur schwach exprimiert wird. So erwies sich der Nachweis mit einem geeigneten DUSP5-Antikörper als schwierig, endogenes DUSP5 konnte bei unstimulierten Zellen im Western Blot nicht nachgewiesen werden. Deshalb sollte der Versuchsansatz der stabilen DUSP5-Überexpression mögliche Effekte verstärken und damit deutlich machen.

Zur Herstellung der Makrophagenzelllinie wurde die codonoptimierte codierende Sequenz des *dusp5*-Genes (GenScript Corporation) verwendet. An die codierende Sequenz wurde ein Flag-Tag angehängt. Damit existiert eine zweite Möglichkeit transfiziertes DUSP5 nachzuweisen.

Anschließend wurde diese Sequenz in den Expressionsvektor pEFsem, der zur späteren Selektion positiver Klone eine Neomycinresistenzkassette enthält, kloniert. Der Vektor wurde mittels „jetPEITM Macrophage Transfektion Kit“ und anschließender Neomycinselektion stabil in die murine monozytische Makrophagenzelllinie RAW 264 integriert (Abbildung 8). Es wurde außerdem eine Kontrollzelllinie generiert bei der der Leervektor stabil ins RAW Genom integriert wurde. Von jeder Zelllinie wurden mindestens zwei voneinander unabhängige Klone generiert.

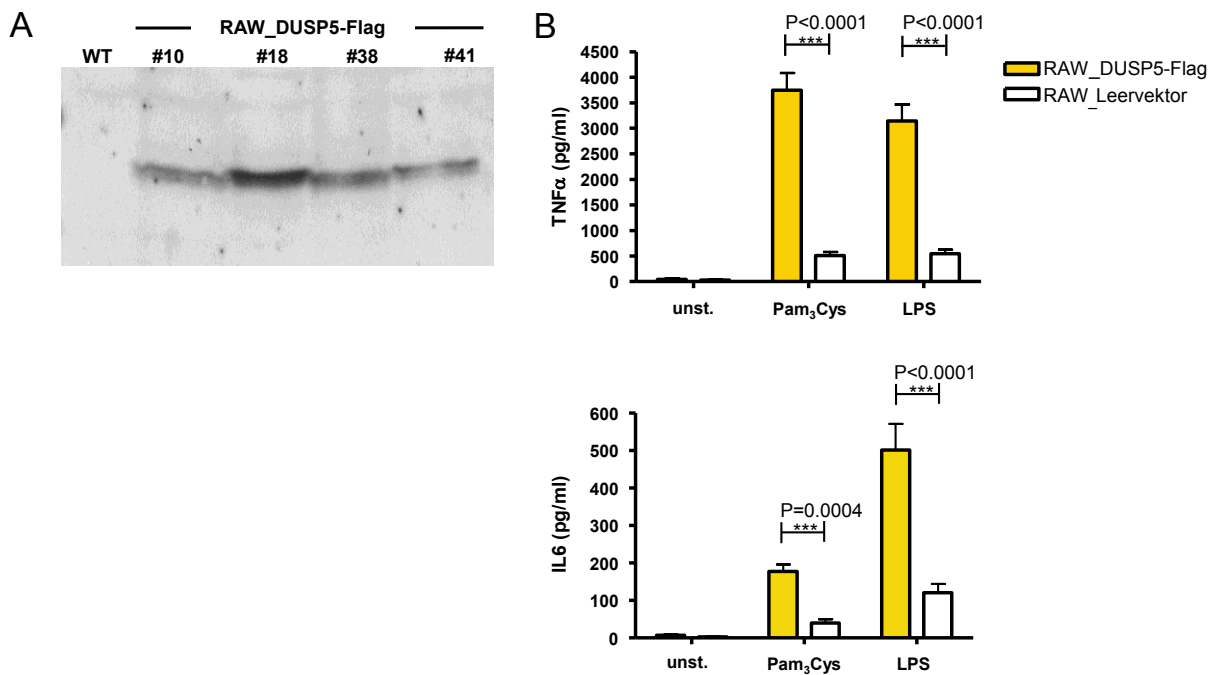


Abbildung 8: Die DUSP5-überexprimierende Makrophagenzelllinie zeigt nach TLR-Stimulation eine erhöhte Zytokinproduktion. (A) Western Blot der unabhängigen Klone #10, #18, #38, #41 zum Nachweis der DUSP5-Expression in DUSP5-überexprimierenden RAW-Zelllinien (RAW_DUSP5-Flag) im Vergleich zur untransfizierten RAW-Zelllinie. (B) ELISA der IL6- bzw. TNF α -Produktion nach Stimulation der Zellen mit Pam₃Cys [1 μ g/ml] bzw. LPS [1 μ g/ml] über Nacht. Ergebnisse gepoolt aus jeweils zwei unabhängigen Klonen, n=6

Die DUSP5-überexprimierende Zelllinie (RAW_DUSP5-Flag) und die Kontrollzelllinie (RAW_Leervektor) wurden durch TLR2 (Pam₃Cys) bzw. TLR4 (LPS) Ligation stimuliert und nach unterschiedlichen Zeiträumen wurden die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL6 und TNF α mittels ELISA im Zellüberstand bestimmt. Die DUSP5-überexprimierende Zelllinie zeigt sowohl nach TLR2- als auch nach TLR4-Aktivierung eine signifikant erhöhte Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL6 und TNF α (Abbildung 8). Dieses Ergebnis legte die Frage nahe, ob der klassische TLR-Signalweg von der DUSP5-Überexpression beeinflusst wird.

4.1.3.2 Die erhöhte Zytokinproduktion ist unabhängig von der ERK-Phosphorylierung

An den nach TLR-Stimulation aktivierten Signalkaskaden sind MAPK beteiligt. Die MAPK ERK1/2 werden spezifisch von DUSP5 deaktiviert. Daher wurde untersucht, welchen Einfluss die DUSP5-Überexpression auf ERK1/2 hat. Die ERK1/2-Aktivität kann anhand des Phosphorylierungszustandes bestimmt werden. Daher wurden die DUSP5-überexprimierenden Zellen (RAW_DUSP5-Flag) und die Kontrollzellen (RAW_Leervektor) in einer Kinetik über unterschiedliche Zeitspannen hinweg an TLR2 (Pam₃Cys) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und im Western Blot die Menge an phosphoryliertem ERK1/2 bestimmt. Im Western Blot ist keine verminderte ERK1/2-Phosphorylierung nachzuweisen (Abbildung 9).

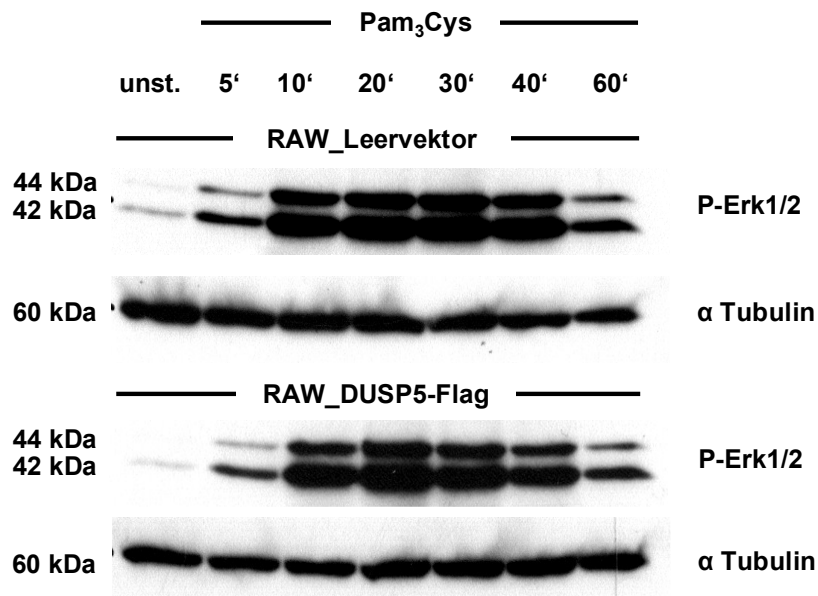


Abbildung 9: TLR2 stimulierte Zellen zeigen keine veränderte ERK1/2-Phosphorylierung. Western Blot zum Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung nach Pam₃Cys-Stimulation über die (in Minuten) angezeigten Zeiträume. Untersucht wurden DUSP5-überexprimierende Zellen (RAW_DUSP5-Flag) im Vergleich zu Leervektor transfizierten Kontrollzellen (RAW_Leervektor). Repräsentativ ist einer von drei mit jeweils zwei unabhängigen Klonen durchgeführten Western Blots dargestellt.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die erhöhte Zytokinproduktion ohne Beteiligung der ERK1/2-Kinaseaktivität stattfindet. Es stellte sich daher die Frage, ob die Wirkung auf ERK eventuell nicht von einer Phosphataseaktivität vermittelt wird. So könnte DUSP5 zum Beispiel an ERK2 binden und so als De-Repressor des auch als transkriptionellen Repressors wirkenden ERK2 fungieren.

4.1.3.3 Die erhöhte Zytokinproduktion erfolgt ohne Beteiligung der Phosphataseaktivität

Um zu untersuchen, ob die immunregulierende Wirkung von DUSP5 auf die Phosphataseaktivität zurückzuführen ist, wurde eine Makrophagenzelllinie generiert, bei der katalytisch inaktives DUSP5 überexprimiert wurde. Dazu wurde die Phosphatasedomäne durch eine C263S-Substitution mutiert, was zum Verlust der Phosphataseaktivität des Proteins führt (41). Der Aminosäureaustausch (C263S) wurde mittels *in vitro* Mutagenese (eurofins, mwg operon) durchgeführt. Die mutierte Makrophagenzelllinie RAW 264 (RAW_DUSP5-C263S) wurde analog zu der DUSP5-überexprimierenden Makrophagenzelllinie (Abschnitt 4.1.3.1) hergestellt (Abbildung 10).

Die Zelllinie mit katalytisch inaktivem DUSP5 (RAW_DUSP5-C263S) wurde über Nacht durch TLR2 (Pam₃Cys) aktiviert und die resultierende TNF α - und IL6-Produktion mittels ELISA im Zellüberstand gemessen. Die Mutante zeigte keinen Unterschied in der TNF α -Produktion im Vergleich zur DUSP5-überexprimierenden Zelllinie (RAW_DUSP5-Flag). Auch bei der Transkription von TNF α ist kein Unterschied zu beobachten (Abbildung 10). Dies zeigt, dass die TNF α -Expression in Makrophagen unabhängig von der Phosphataseaktivität von DUSP5 ist.

4.1.3.4 Die erhöhte Zytokinproduktion ist abhängig von der NLS-Domäne

Wie im vorherigen Experiment gezeigt werden konnte, ist die TLR2-vermittelte Zytokinexpression unabhängig von der Phosphataseaktivität von DUSP5. Es stellte sich daher die Frage, auf welche Weise DUSP5 die Zytokinproduktion vermittelt. Es ist bekannt, dass DUSP5 ein nukleäres Protein ist. Jedoch ist über die Mechanismen, mit denen diese Lokalisation gewährleistet wird, und die physiologische Bedeutung der Lokalisation wenig bekannt. In Kernfraktionierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass endogenes DUSP5 ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist (41), für die Translokation in den Zellkern besitzt DUSP5 ein funktionales NLS (41). Es wurde eine Makrophagenzelllinie generiert, bei der die NLS durch den Austausch der Aminosäuren Arginin 12, 16 und Lysin 13, 17 jeweils durch Glycin und Alanin mutiert ist. Diese Mutation wurde mittels *in vitro* Mutagenese (eurofins, mwg operon) synthetisiert.

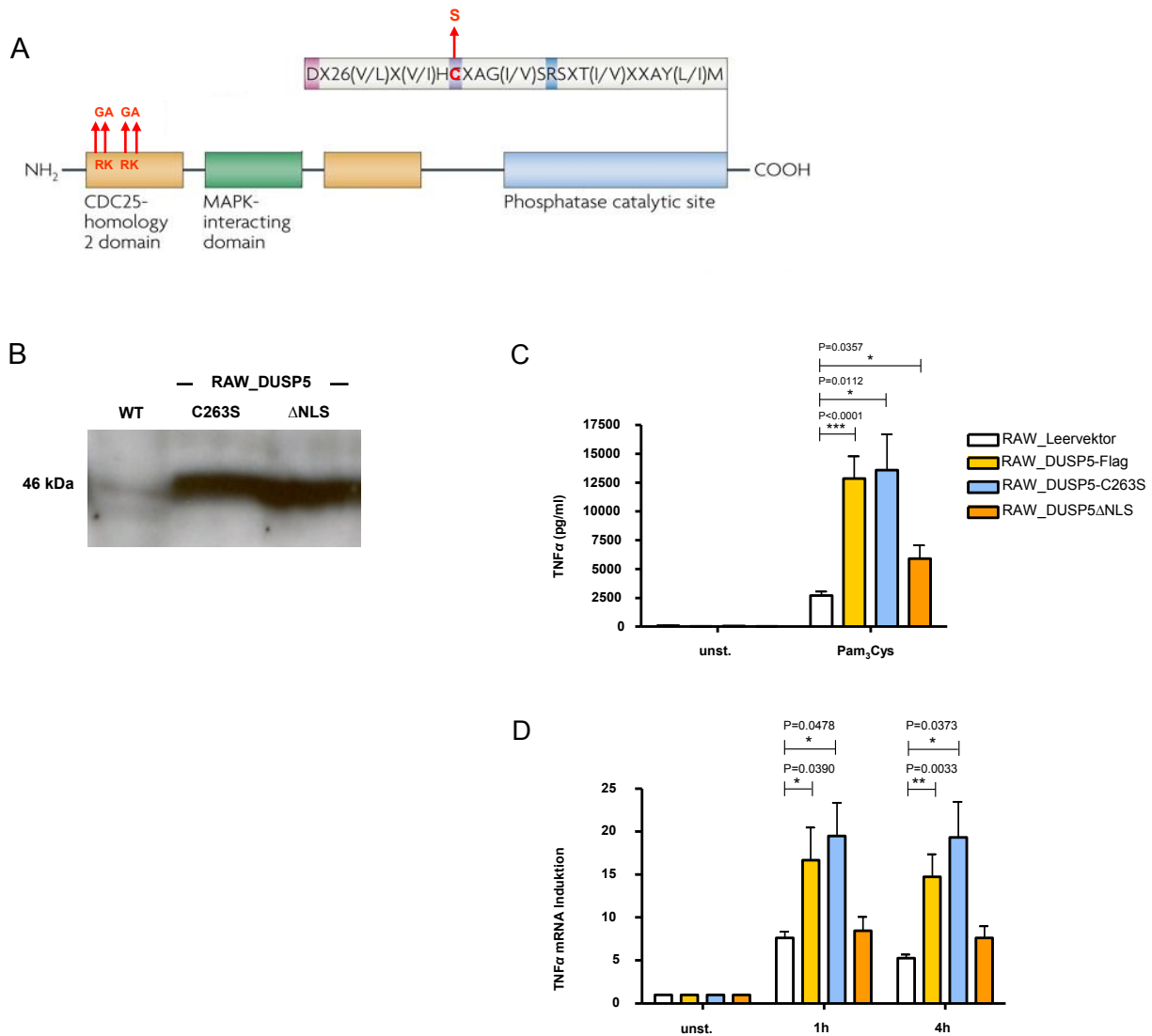


Abbildung 10: Die katalytisch inaktive DUSP5-überexprimierenden Makrophagenzelllinie zeigt nach TLR2-Stimulation eine erhöhte Zytokinproduktion, die in der NLS mutierte DUSP5-überexprimierenden Makrophagenzelllinie zeigt nach TLR2-Stimulation keine erhöhte Zytokinproduktion. (A) Schematische Darstellung der verschiedenen DUSP5-Domänen. Rot dargestellt sind die Aminosäuren die zur Generierung der jeweiligen Makrophagenzelllinie RAW_DUSP5-C263S bzw. RAW_DUSP5 Δ NLS ausgetauscht wurden. (B) Western Blot zum Nachweis der DUSP5-Expression in der katalytisch inaktiven DUSP5-überexprimierenden RAW-Zelllinie (RAW_DUSP5-C263S) und in der NLS mutierten DUSP5-überexprimierenden RAW-Zelllinie (RAW_DUSP5 Δ NLS) im Vergleich zur untransfizierten RAW-Zelllinie. (C) ELISA der TNF α -Produktion nach Stimulation der Zellen mit Pam₃Cys [1 μ g/ml] über Nacht. Ergebnisse gepoolt aus jeweils zwei unabhängigen Klonen, n=6-18. (D) qRT-PCR der TNF α -mRNA Expression nach Stimulation der Zellen mit Pam₃Cys [1 μ g/ml] für 1h bzw. 4h. Ergebnisse gepoolt aus jeweils zwei unabhängigen Klonen, n=11-26

Das so mutierte Protein kann nicht mehr in den Zellkern transportiert werden (41). Die mutierte Makrophagenzelllinie RAW 264 (RAW_DUSP5 Δ NLS) wurde analog zu der DUSP5-überexprimierenden Makrophagenzelllinie (RAW_DUSP5-Flag) (Abschnitt 4.1.3.1) hergestellt (Abbildung 10). Die Zelllinien (RAW_DUSP5 Δ NLS und RAW_Leervektor) wurden über Nacht TLR2 (Pam₃Cys) aktiviert und am nächsten Tag mittels ELISA die Konzentration des pro-inflammatorischen Zytokines TNF α im Zellüberstand bestimmt. In

allen Zellen resultierte die Stimulation in einem Anstieg von $\text{TNF}\alpha$. Im Vergleich zu den als Positivkontrolle eingesetzten RAW_DUSP5-Flag Zellen kann jedoch ein deutlicher Unterschied beobachtet werden. RAW_DUSP5 Δ NLS Zellen zeigen eine signifikant ($P = 0.0076$) geringere $\text{TNF}\alpha$ -Produktion. Diese Ergebnisse konnte auf Transkriptionsebene bestätigt werden (Abbildung 10). Dies zeigt, dass der Effekt von DUSP5 auf die $\text{TNF}\alpha$ -Expression abhängig von einer funktionalen NLS ist.

4.2 Generierung eines DUSP5-Knockout Mausstammes

Die gezielte Mutation von Genen im Mausgenom stellt ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung von Genfunktionen dar. Das Modell der Knockout Maus ermöglicht dabei die Betrachtung der Auswirkung eines Genverlustes auf den gesamten Organismus. Damit können sowohl spezifische Signalwege untersucht werden, als auch neue, unbekannte Funktionen des Proteins identifiziert werden. Besonders bei der Komplexität und Interaktion der bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort beteiligten Signalwege sind Tiermodelle von großer Bedeutung. Bei der konditionalen DUSP5-Knockout Maus wurde mittels genetischer Manipulation das DUSP5 codierende Gen gezielt inaktiviert. Dieses neue Mausmodell soll zu neuen Erkenntnissen der *in vivo* Funktion von DUSP5 bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort beitragen.

Bei dem in dieser Arbeit gewählten Modell des konditionellen Knockouts kann DUSP5 durch gezielte Kreuzung in bestimmten Geweben spezifisch deletiert werden. Dies ist immer dann essentiell, wenn nicht bekannt ist, ob der ubiquitäre Totalverlust (konventioneller Knockout) letal sein könnte und damit das Gen nicht mehr weiter untersucht werden kann. Außerdem könnten eventuell kompensatorische Effekte auftreten. Da DUSP5 in vielen Geweben exprimiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass dieses Gen eine grundlegende Funktion im Organismus hat. Aus diesem Grund wurde ein Modell gewählt, bei dem das *dusp5*-Gen ubiquitär aber auch gezielt in einzelnen Geweben inaktiviert werden kann. Die Generierung der Knockout Maus kann dabei in drei Schritte unterteilt werden.

4.2.1 Schritt 1: Klonierung eines DUSP5-Inaktivierungsvektors

Das *dusp5*-Gen besteht aus insgesamt vier Exons. Im ersten Schritt zur Herstellung einer DUSP5-Knockout Maus wurde ein Inaktivierungsvektor (Abbildung 11) generiert, welcher aus dem zu inaktivierenden Gen besteht, in dem Exon 1 mit *loxP*-Sequenzen flankiert wurde. Somit ist keine Expression des Zielgens mehr möglich. Zunächst wurden mittels PCR drei

Sequenzen des *dusp5*-Genes amplifiziert. Als Matrize (Template) diente dabei die genomische DNA von E14.1 embryonalen Maus-Stammzellen. Alle Amplifikate wurden in den pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor zwischenkloniert und in diesem Vektor mittels verschiedener Restriktionsspaltungen analysiert und anschließend sequenziert. Die so kontrollierten Fragmente wurden daraufhin in den Zielvektor pBluescript II KS (-) MCS+ kloniert. Die erste homologe Sequenz (kurzer Arm [KA]) ist 544 Basenpaare (bp) lang und befindet sich *downstream* von Exon 1 des *dusp5*-Genes. Diese Sequenz wurde mittels Restriktion mit den Enzymen *XhoI/KpnI* und anschließender Ligation in den Zielvektor kloniert. Die zweite Sequenz (langer Arm 5' [LA5']) liegt *upstream* von Exon 1, ist 1.478 bp lang und wurde *NotI/XbaI* kloniert. Diese beiden Sequenzen ermöglichen aufgrund der langen homologen Bereiche die homologe Rekombination. Die dritte DUSP5 codierende Sequenz (langer Arm 3' [LA3']) ist 1.478 bp lang und beinhaltet Exon 1. Dieses Fragment wurde unter Verwendung der Restriktionsschnittsenzyme *EcoRI/EcoRV* in den Zielvektor kloniert und stellt die zentrale Sequenz dar, die mittels homologer Rekombination ins Genom integriert werden soll.

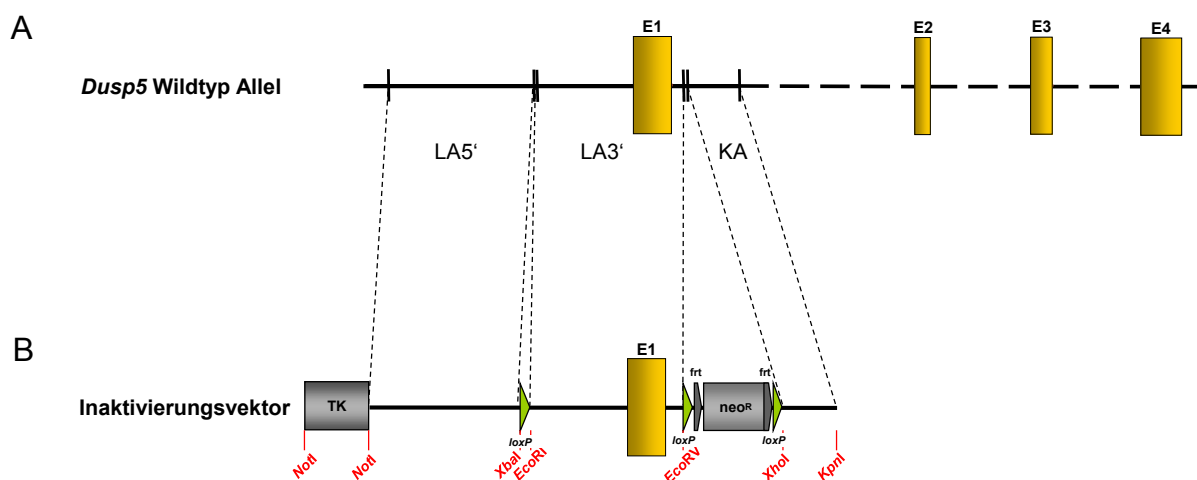


Abbildung 11: Strategie zur Generierung eines Inaktivierungsvektors. Das Wildtyp Allel (A) des *dusp5*-Genes diente als Template für die Generierung verschiedener *dusp5*-Sequenzabschnitte (LA5', LA3', KA). Diese wurden mittels spezifischer Primer amplifiziert und über die angezeigten Restriktionsschnittstellen schrittweise in den Zielvektor pBluescript II KS(-) MCS+ kloniert. Als nächster Schritt erfolgte die Amplifikation und Ligation der *loxP*-Sequenz. Die Fertigstellung des Inaktivierungsvektors (B) erfolgte durch Ligation der Neomycinresistenzkassette (*neoR*) und der Thymidinkassette (TK).

Die Generierung des konditionellen Knockouts erfolgte unter Anwendung des Cre/*loxP*-Rekombinationssystems. Die Inaktivierung des *dusp5*-Genes wird in diesem System durch die Cre (*cyclization recombination*)-Rekombinase, welche die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA zwischen spezifischen Erkennungssequenzen (*loxP*) katalysiert, ermöglicht. Soll aus

einem DNA-Strang eine bestimmte DNA-Sequenz entfernt werden, setzt man gezielt vor und hinter diesen DNA-Abschnitt eine *loxP*-Sequenz, was als floxen bezeichnet wird (floxed = *flanked by loxP*). Die Cre-Rekombinase erkennt und bindet die jeweilige *loxP*-Sequenz und schneidet, wenn die beiden *loxP*-Sequenzen in gleicher Richtung orientiert sind die entsprechende DNA-Sequenz heraus. Die beiden verbleibenden *loxP*-Enden werden zusammengefügt, der entstehende kurze ringförmige DNA-Abschnitt wird in der Zelle abgebaut (107) (108).

Die zuvor generierte Exon 1 codierende Sequenz (LA3') des *dusp5*-Genes wurde im nächsten Klonierungsschritt *gefloxt*. Dazu wurde zwischen diese beiden Teile des langen Armes die *loxP*-Sequenz kloniert. Die *loxP*-Stelle wurde mittels PCR amplifiziert und über die Schnittstellen *XbaI/EcoRI* in den Zielvektor kloniert. Die Orientierung aller Klonierungsfragmente wurde nach Integration in den Zielvektor mittels Restriktionsspaltungen analysiert und die Übergänge der einzelnen Fragmente im Zielvektor sequenziert. Dadurch erfolgt nach Kreuzung mit Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen eine gezielte Abschaltung des *dusp5*-Genes in einzelnen Geweben oder ubiquitär, je nach zur Kreuzung verwendeter Cre-Rekombinase-Maus.

Da die homologe Rekombination bei Säugetierzellen ein sehr seltenes Ereignis darstellt, ist ein wirksames Selektionsverfahren notwendig, um rekombinante Zellen zu identifizieren. Dabei ist es wichtig zu untersuchen, ob eine festgestellte Integration mittels homologer Rekombination stattgefunden hat. Um dies nachzuweisen werden zwei zusätzliche Resistenzkassetten in den Geninaktivierungsvektor kloniert. Das Genprodukt der Neomycin-Resistenzkassette dient dabei als positiver Selektionsmarker und zeigt an, ob der Geninaktivierungsvektor ins Genom integriert wurde. Die Kassette codiert eine Neomycin-Phosphotransferase die das Wachstum von rekombinierten ES-Zell-Klonen in Gegenwart des Antibiotikums Geneticin (G418) ermöglicht, indem es Geneticin an den Hydroxygruppen phosphoryliert und damit die eukaryotische Zelltoxizität des Antibiotikums unterdrückt. Die Neomycin-Resistenzkassette wurde *EcoRV/XhoI* kloniert. Um zu untersuchen, ob die Integration über homologe Rekombination erfolgt ist, wird das Gen für die Thymidinkinase als Marker für eine negative Selektion verwendet. Bei Behandlung mit Ganciclovir wird durch die Expression dieser Kinase ein Produkt gebildet, welches die Replikation der Zellen hemmt, wenn die Thymidinkinase als Ganzes exprimiert wird. Da bei der homologen Rekombination der Einbau normalerweise abbricht, sobald die Sequenz nicht mehr homolog

ist, wird der Thymidinkinase-Leserahmen zerstört. Dadurch kann keine funktionsfähige Thymidinkinase mehr exprimiert werden und die Zellen überleben die Behandlung mit dem Virostatikum Ganciclovir. Damit ist der Einbau an einer definierten Stelle im Genom gewährleistet. Die TK Kasette wurde *NotI/NotI* kloniert. Alle Zwischenklonierungen sowie der fertige Inaktivierungsvektor wurden durch Restriktionsspaltungen (Abbildung 12) kontrolliert und die Klonierungsschnittstellen zusätzlich sequenziert.

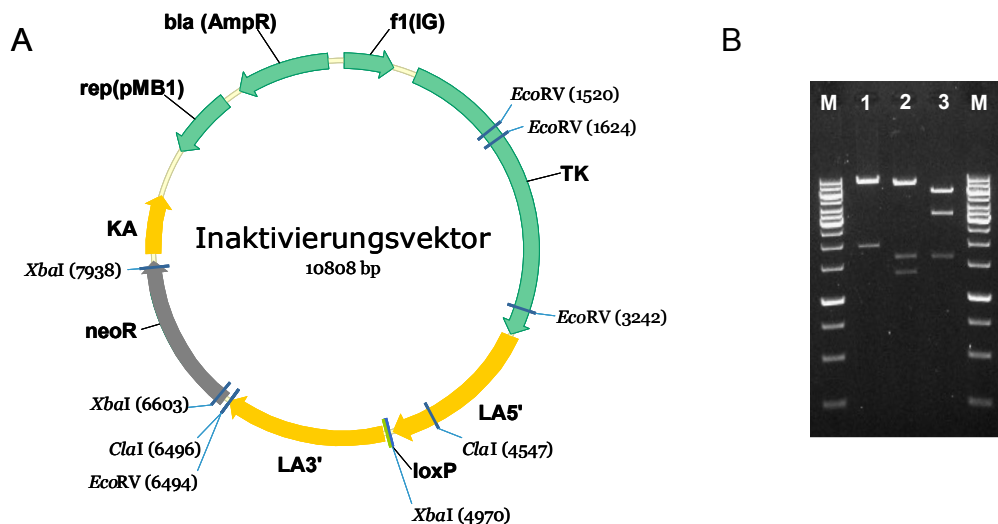


Abbildung 12: Untersuchung des Inaktivierungsvektors. (A) Vektorkarte des Inaktivierungsvektors. Dargestellt sind die Restriktionsenzyme *ClaI*, *XbaI* und *EcoRV* mit ihren jeweiligen Restriktionsschnittstellen. (B) Restriktionsspaltung des Inaktivierungsvektors mit den Restriktionsenzymen (1) *ClaI*, (2) *XbaI* und (3) *EcoRV*. M, GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

4.2.2 Schritt 2: Generierung homolog rekombinierter ES-Zellen

Der Inaktivierungsvektor wurde durch Elektroporation in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) übertragen. Die verwendeten ES-Zellen waren *in vitro* Zellkulturen von aus Blastozysten des Inzuchtmausstammes E14.1 (vom Stamm 129Sv) isolierten ES-Zellen (88). Der DNA-Austausch erfolgt dann mittels homologer Rekombination. Für die Erzeugung von mutierten $DUSP5^{\text{floxed-neo/+}}$ ES-Zellen musste der Inaktivierungsvektor zunächst mit dem Restriktionsenzym *AleI* linearisiert werden. Die ES-Zellen wurden anschließend mit dem linearisierten Geninaktivierungsvektor elektroporiert und auf embryonalen Fibroblasten (EF-Zellen) kultiviert. Ab Tag zwei wurden die Zellen dann in Anwesenheit von Ganciclovir und G418 kultiviert. Nach zwölf Tagen konnten dann Klone selektioniert, auf 96 *well* Platten überführt und expandiert werden. Bei Konfluenz der Platten wurden diese auf drei 96 *well* Platten gesplittet und erneut expandiert. Anschließend wurden Klone einer der 96 *well* Platten

jeweils auf eine 48 *well* Platte überführt, eine weitere 96 *well* Platte bei -20°C zur Sicherheit zurückgelegt und die dritte Platte für eine „Screening-PCR“ verwendet. Hierbei wurden die Zellen auf eine PCR-Platte überführt, auf dieser lysiert und anschließend in einer Screening-PCR-Reaktion amplifiziert.

Bei der Screening-PCR bindet ein Primer im Geninaktivierungsvektor. Auf diese Weise wird der „kurze Arm“ inklusive des Genom-Überganges amplifiziert. Dadurch konnte nur bei erfolgreicher homologer Rekombination ein Amplifikat entstehen. Drei von insgesamt 300 ES-Zellklonen zeigten ein positives Signal (Abbildung 13). Das jeweilige PCR Produkt wurde aus dem Gel eluiert, in den pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor kloniert und in dieser Form sequenziert. Alle Klone haben die richtige Sequenz integriert und wurden anschließend auf der 48 *well* Platte identifiziert und solange expandiert, bis Aliquots eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert werden konnten.



Abbildung 13: Screening-PCR der ES-Zellklone. (A). Dargestellt ist das *Dusp5*^{flox-neo}-Allel, welches mittels spezifischer Primer amplifiziert werden kann. (B) PCR zum Nachweis des *Dusp5*^{flox-neo}-Alleles. Bei drei ES-Zellklonen (#24, #79, #120) lässt sich das mutierte Allel nachweisen. M, GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder

Der endgültige Nachweis positiver Klone erfolgte im Anschluss daran durch Southern Blot Analyse (Abbildung 14). In die Neomycinresistenzkassette wurde eine zusätzliche *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle eingeführt, die den Nachweis des gesamten mutierten Allels erlaubt. Die isolierte genomische DNA wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI verdaut, nach einer Agarosegel-Trennung auf eine Nylonmembran geblottet und anschließend mit einer radioaktiv markierten Gensonde, hybridisiert. Diese Gensonde bindet mittels Basenpaarung. Die Sonde hat eine Fragmentgröße von 463 bp und enthält die *dusp5*-Sequenz. Sie wurde mittels PCR amplifiziert, und in Form des pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor zur Kontrolle sequenziert. Im Southern Blot sind dann die Fragmente zu erkennen, die mit der Sonde komplementäre Sequenzen aufweisen. So lässt sich über die detektierten Fragmentgrößen sowohl das WT-Allel als auch das mutierte Allel nachweisen. Das WT-Allel zeigt eine

Fragmentgröße von 8.523 bp, das mutierte Allel ist aufgrund einer eingebauten artifiziellen *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle verkürzt und nur 5.552 bp lang.

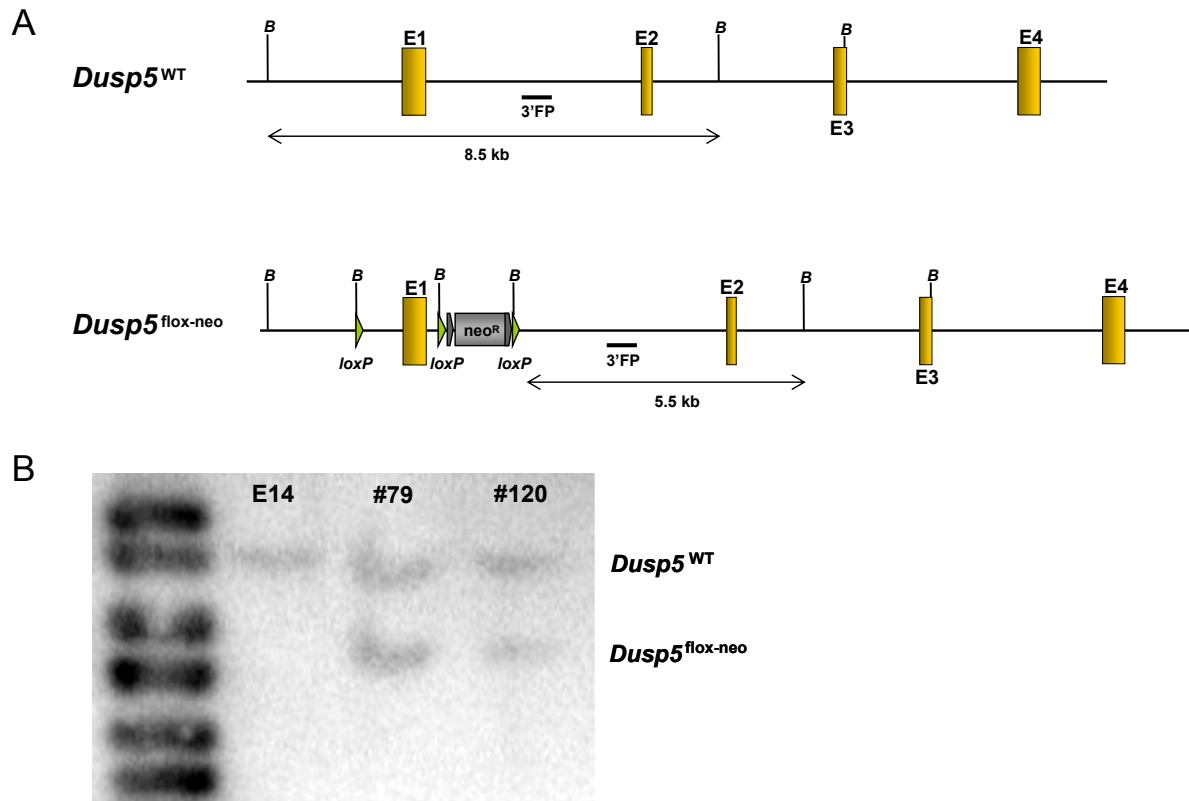


Abbildung 14: Analyse der transfizierten ES-Zellklone. Strategie zur Analyse von ES-Zellklonen mittels Southern Blot Analyse (A). Dargestellt ist das Wildtyp *dusp5*-Allel, welches nach Restriktion mit *Bam*HI ein DNA-Fragment von 8.523 bp ergibt. Zum Nachweis der Vektorintegration wurde in den Inaktivierungsvektor eine zusätzliche *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle eingebaut, welche nach Integration ins ES-Zellgenom ein DNA-Fragment von 5.552 bp liefert und damit als Nachweis des mutierten Allels dient. Zur Southern Blot Analyse (B) homolog rekombinierter ES-Zellklone wurde aus in der PCR positiv getesteten ES-Zellklonen genomische DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI (Schnittstellen mit B markiert) behandelt. Nach der Restriktionsspaltung wurden die DNA-Fragmente im Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblotet und anschließend mit einer radioaktiv markierten Sonde (3'FP) hybridisiert. Dargestellt ist das Ergebnis der Hybridisierung der beiden ES-Zellklone (#79, #120). Als Kontrolle wurde genomische DNA einer Wildtyp-Maus (E14) eingesetzt. Die Bande bei 8.523 bp repräsentiert das Wildtyp- und die Bande bei 5.552 bp das mutierte Allel.

4.2.3 Schritt 3: Generierung eines *DUSP5*^{-/-} Mausstammes aus rekombinanten ES-Zellen

Um einen *DUSP5*^{-/-} Mausstamm zu generieren, wurden homolog rekombinierte ES-Zellen in 2,5 Tage alte Blastozysten von C57BL/6 Spendertieren injiziert. Die Blastozysten wurden anschließend in die Uteri von pseudoschwangeren Weibchen transferiert. Auf diese Weise entstehen aus den implantierten Blastozysten chimäre Mäuse. Die Blastozysteninjektion wurde von Dr. Michael Bösl am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried

durchgeführt. Da die verwendeten ES-Zellen heterozygot (M/m) für die spezifische Mutation und homozygot (A/A) für die Fellfarbe agouti und die Blastozyste homozygot für die Fellfarbe schwarz (a/a) ist, können anhand der Fellfarbe Rückschlüsse auf den Grad des Chimärismus geschlossen werden. Dieser spiegelt hierbei den Anteil der homolog rekombinierten ES-Zellen am Gesamtorganismus wieder. Die dabei generierten hochchimären Mäuse (Fellfarbe entsprach überwiegend dem Typ agouti) wurden mit C57BL/6 Mäusen verpaart (Abbildung 15).

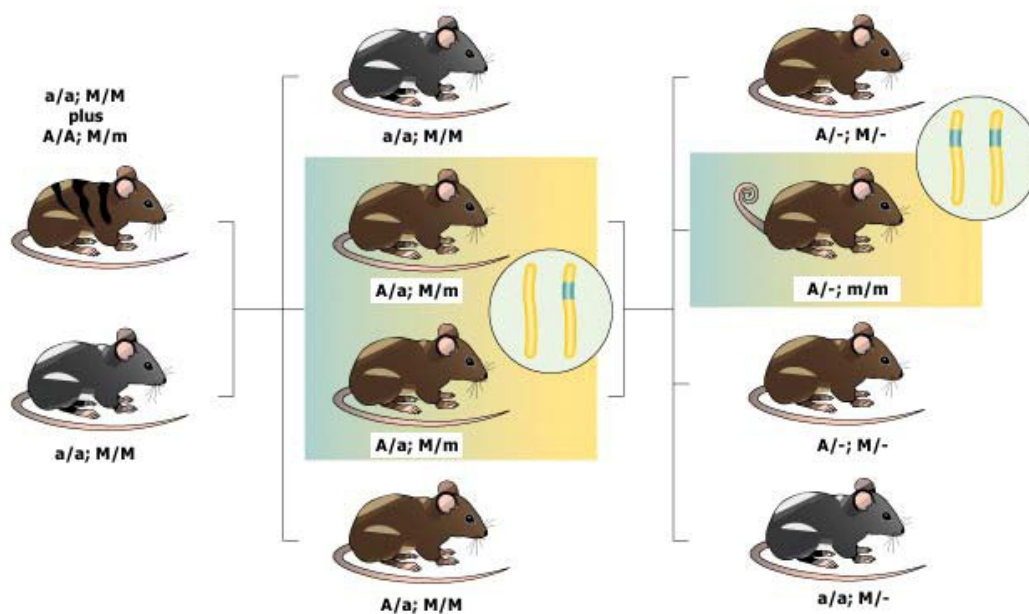


Abbildung 15: Verpaarungsschema einer chimären Maus mit einer C57BL/6 Maus. Da das agouti-Allel der 129Sv ES-Zellen gegenüber dem Allel für die schwarze Fellfarbe der C57BL/6 Mäuse dominant ist, können über die Fellfarbe agouti heterozygote Tiere identifiziert werden (100).

Bei erfolgreicher Keimbahntransmission des $Dusp5^{\text{flox-neo}}$ -Allels liegt die Wahrscheinlichkeit, dass das mutierte Allel an die Nachkommen weitergegeben wird bei 50%. Da die Fellfarbe schwarz rezessiv ist, müssen lediglich Nachkommen mit der Fellfarbe agouti auf Keimbahntransmission untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde aus Schwanz-Biopsien DNA isoliert und das Vorhandensein des $Dusp5^{\text{flox-neo}}$ -Alleles mittels Genotypisierungs-PCR überprüft.

Bei den nachfolgenden Verpaarungen wurden drei unterschiedliche Ansätze gewählt. Ziel aller Verpaarungen ist der gezielte DUSP5-Verlust. Erzielt wird dieser mithilfe von Mäusen, die die Rekombinase Cre exprimieren, Folge der Expression ist die Deletion gefloxter Allele (107). Erstens wurden heterozygote Mäuse ($Dusp5^{\text{flox-neo/+}}$) mit LysMCre-Mäusen verpaart,

was zu einer Deletion des geflochtenen Alleles in myeloiden Zellen führt (Abbildung 16). Dieser Ansatz wurde gewählt, da zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt war, ob eine ubiquitäre Deletion von DUSP5 letal ist. Homozygote Tiere der nachfolgenden Generationen wurden in Experimenten zur Untersuchung der Auswirkung des DUSP5-Knockout in Makrophagen auf die Zytokinproduktion nach TLR2-Stimulation eingesetzt. Zweitens wurden homozygote Tiere mit „Deleter-Cre“ Mäusen verpaart (Abbildung 16). Diese exprimieren die Rekombinase Cre in der Keimbahn und führen damit zum ubiquitären DUSP5-Verlust. Diese Tiere wurden für Untersuchungen der B- und T-Zellentwicklung eingesetzt. Drittens wurde mit heterozygoten Tieren eine Rückkreuzung auf C57BL/6 durchgeführt. Dies ist notwendig, da erst nach zehn Generationen von einem einheitlichen genetischen C57BL/6-Hintergrund ausgegangen werden kann. Erst danach können die Tiere im Infektionsmodell (z.B. CASP) untersucht werden.

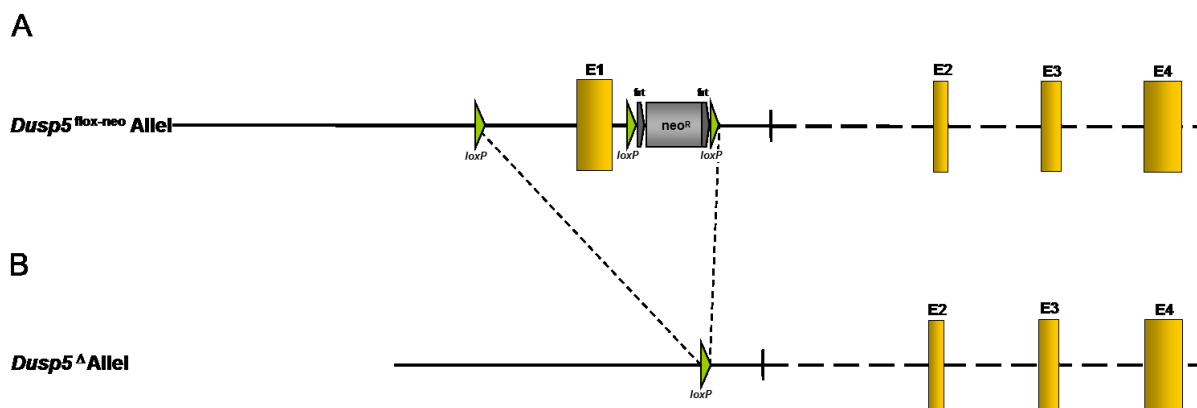


Abbildung 16: Generierung des DUSP5-Knockout durch Cre-Rekombination. Aus geflochtenen Allelen (*Dusp5^{flox-neo}*) (A) wird der DUSP5-Knockout (B) generiert. Dies erfolgt durch Kreuzung mit Cre Deleter bzw. LysMCre Mäusen, die durch Expression der Cre-Rekombinase den Knockout herstellen. Die Cre-Rekombinase erkennt und schneidet spezifisch *loxP*-flankierte DNA Sequenzen und ligiert die verbleibenden Enden.

Es wurde eine PCR zum Nachweis der am weitesten 5' gelegenen *loxP*-Sequenz (Abbildung 17) etabliert. Zur Durchführung dieser PCR wurde ein Primer generiert, der spezifisch einen Bereich der *loxP*-Sequenz bindet. Der zweite Primer bindet upstream im *dusp5*-Allel. Es wird daher nur ein Amplifikat gebildet, wenn die *loxP*-Sequenz vorhanden ist. Dieses Amplifikat wurde sequenziert. Der somit erfolgte Nachweis (Abbildung 17) der *loxP*-Sequenz ist sehr wichtig, da nicht vorher gesagt werden kann, wo die homologe Rekombination stattgefunden hat. So könnte z.B. trotz Nachweis der Neomycinresistenzkassette die 5'-*loxP*-Sequenz nicht mit integriert sein.

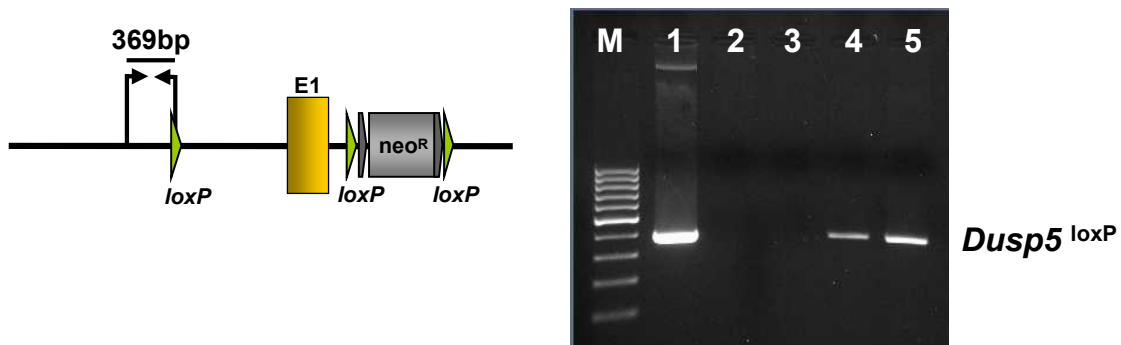


Abbildung 17: Nachweis der 5'-loxP-Sequenz. PCR zum Nachweis der 5'-loxP-Sequenz. Aus den Nachkommen der chimären Mäusen wurde genomische DNA isoliert und mit spezifischen Primern (ein Primer bindet spezifisch direkt in der loxP-Sequenz) wurde die Mutation im Inaktivierungsvektor (1) und in Knockout-Mäusen (4,5) nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurden WT-Mäuse (2,3) verwendet. M, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder

Alle Mäuse wurden mittels PCR-Analyse genotypisiert, um homozygote von heterozygoten und WT-Mäusen unterscheiden zu können (Abbildung 18). Dazu wurde aus Schwanzbiopsien genomische DNA isoliert und in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

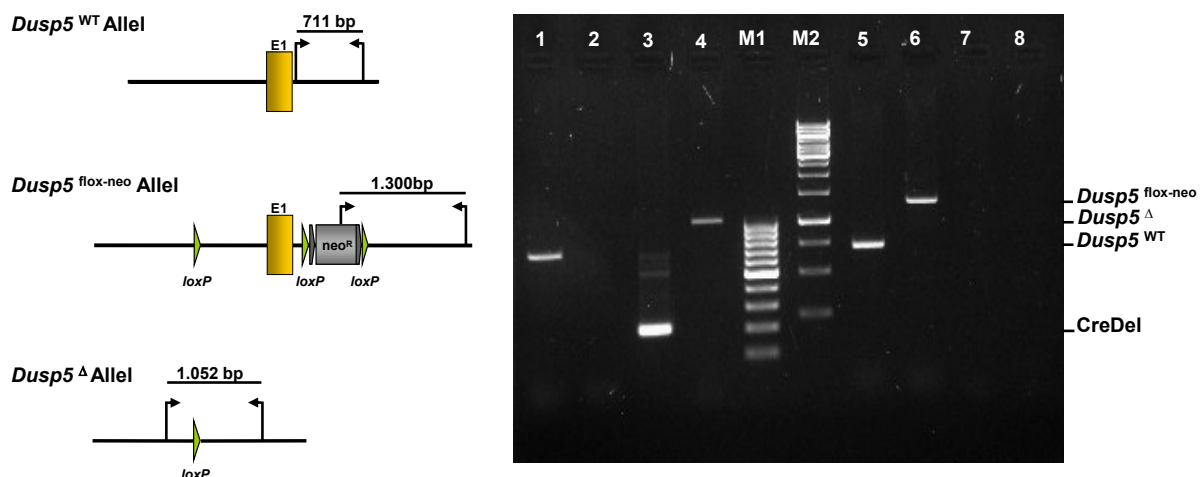


Abbildung 18: Nachweis der mutierten Allele. Mittels PCR wurden die Tiere genotypisiert. Dazu wurden PCRs etabliert, mithilfe derer das Wildtyp *Dusp5*-Allel (1), das *Dusp5*^{flox-neo}-Allel (6), CreDel (3) und der *Dusp5*-Knockout (4) spezifisch nachgewiesen werden können. Bei *Cre*-Rekombinase Expression kann kein *Dusp5*^{flox-neo}-Allel mehr nachgewiesen werden (2), da die *Cre*-Rekombinase den Knockout bereits generiert hat. Stattdessen kann hier der Knockout nachgewiesen werden (4). Wird die *Cre*-Rekombinase nicht exprimiert (7) kann das *Dusp5*^{flox-neo}-Allel nachgewiesen werden (2), es hat kein *Dusp5*-Knockout (8) stattgefunden. M1, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder; M2, GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder. Die Genotypisierung zweier Tiere ist exemplarisch dargestellt. Tier 1 (1-4) hat den Genotyp *Dusp5*^{WT/Δ}; CreDel^{+/+} und Tier 2 (5-8) hat den Genotyp *Dusp5*^{WT/flox-neo}; CreDel^{-/-}.

Als Bestätigung des Knockouts wurde schließlich mittels qRT-PCR (Abbildung 19) und Western Blot (persönliche Mitteilung N. Schlirf) nachgewiesen, dass in den Knockout-Mäusen kein DUSP5 mehr transkribiert bzw. translatiert wird.

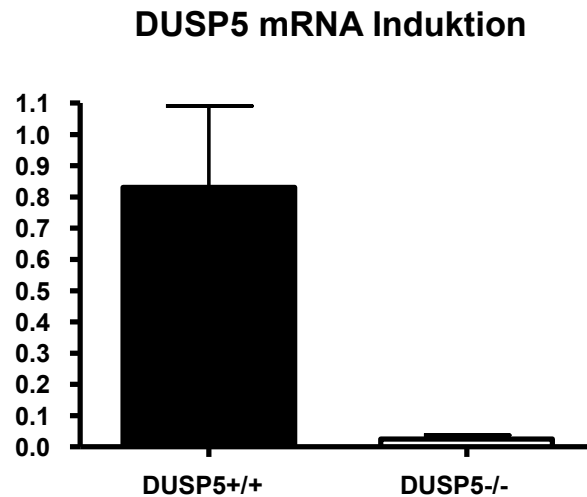


Abbildung 19: Nachweis des DUSP5-Knockout in knochenmarksgenerierten Makrophagen. Quantitative RT-PCR der DUSP5-Genexpression in Knockout- und WT-Geschwistermäusen. Aus den knochenmarksgenerierten Makrophagen wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in der qRT-PCR eingesetzt. Die Expression von DUSP5 ist im Verhältnis zu PPIA und bezogen auf WT-Geschwistermäuse dargestellt. n=5

4.3 Phänotypische Charakterisierung der DUSP5-Knockout Maus

Die DUSP5-Knockout Mäuse sind vital, fertil und zeigen makroskopisch keinen veränderten Phänotyp. Wichtige Immunorgane (wie Milz, Thymus, Lymphknoten) waren normal entwickelt.

4.3.1 Immunologische Charakterisierung der DUSP5-Knockout Maus

4.3.1.1 DUSP5-Knockout Makrophagen zeigen nach TLR2-Stimulation keine veränderte Zytokinproduktion

Da die DUSP5-überexprimierenden Makrophagenzelllinie nach TLR-Stimulation eine erhöhte Zytokinproduktion zeigte, sollte untersucht werden ob der DUSP5-Verlust umgekehrt zu einer verminderten Zytokinproduktion führt. Um dies zu untersuchen, wurden Mäuse generiert, die kein DUSP5 mehr in myeloiden Zellen exprimieren. Aus diesen Mäusen und aus WT-Geschwistermäusen wurden knochenmarksgenerierte Makrophagen gewonnen und untersucht, ob diese *ex vivo* Makrophagen nach TLR-Stimulation eine veränderte Zytokinexpression zeigen. Zuvor wurde mittels FACS-Analyse Makrophagen spezifischer Antigene (F4/80; CD11b) nachgewiesen, dass es sich bei den generierten Zellen um Makrophagen handelt. Die knochenmarksgenerierten Makrophagen wurden mit Pam₃Cys an TLR2 stimuliert. Anschließend wurde mittels ELISA die IL6- und TNF α -Konzentrationen im Überstand bestimmt. Alle Zellen konnten durch Pam₃Cys aktiviert werden und produzierten

vermehrt IL6 bzw. TNF α . Die Konzentration der produzierten Zytokine war dabei proportional zur Dauer der Stimulation. Zwischen den Knockout- und WT-Mäusen konnte jedoch kein Unterschied in der TNF α - und IL6-Produktion festgestellt werden. Dieses Ergebnis war unabhängig von der eingesetzten Pam₃Cys-Konzentration (Ergebnis nicht dargestellt) oder der Dauer der Stimulation. Auch auf Transkriptionsebene konnte dieses Ergebnis für TNF α bestätigt werden, so zeigte die Untersuchung der TNF α -mRNA Expression nach TLR2-Aktivierung zwar einen Anstieg der mRNA jedoch keinen Unterschied zwischen Knockout- und WT-Mäusen (Abbildung 20).

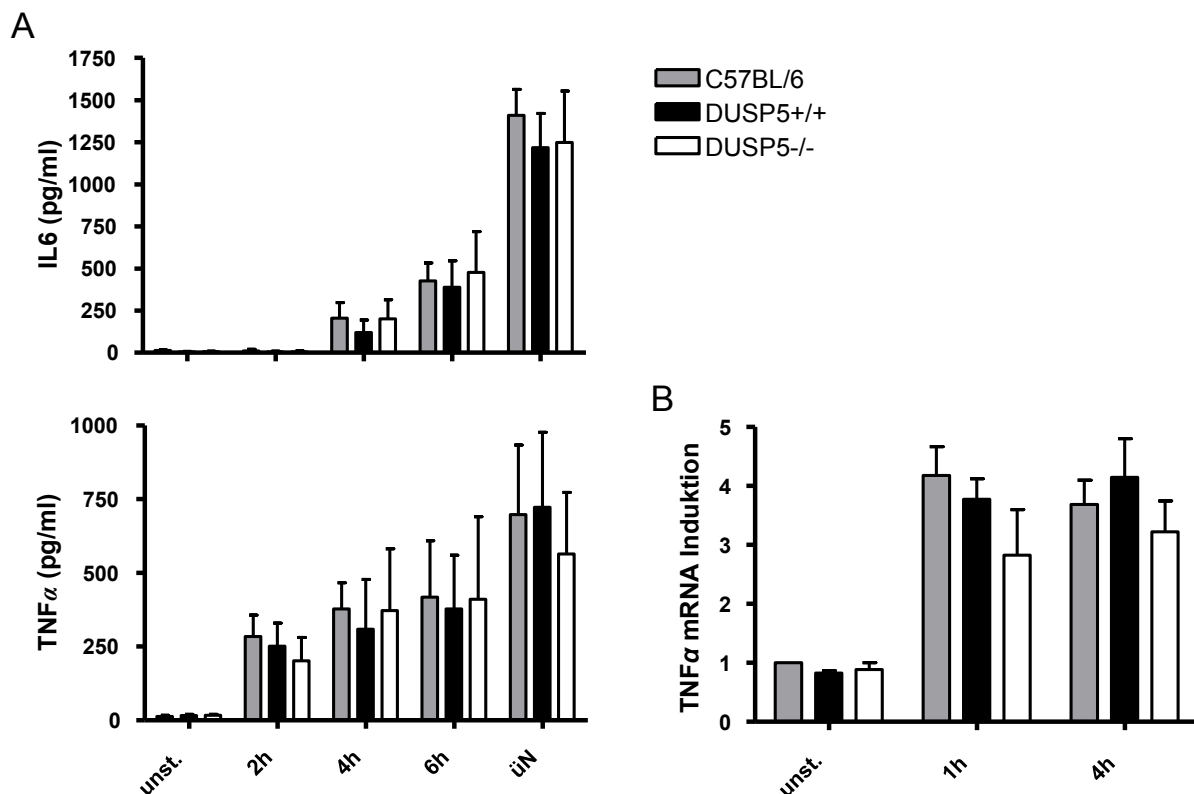


Abbildung 20: DUSP5^{-/-} Makrophagen zeigen nach TLR2-Stimulation keine veränderte IL6- und TNF α -Produktion. (A) ELISA der IL6- bzw. TNF α -Produktion in knochenmarksgenerierten Makrophagen aus DUSP5-Knockout-, LysMCre- und C57BL/6-Mäuse. Nach sechstägiger Kultivierung wurden die Zellen über unterschiedlich lange Zeiträume mit Pam₃Cys [1 μ g/ml] stimuliert; anschließend wurde die IL6- bzw. TNF α -Produktion im Überstand bestimmt. 2h, 4h, 6h: n=4; üN: n=5. (B) Quantitative RT-PCR der TNF α -mRNA Expression in knochenmarksgenerierten Makrophagen aus DUSP5-Knockout-, LysMCre- und C57BL/6-Mäuse nach Pam₃Cys [1 μ g/ml] Stimulation für 1h bzw. 4h. n=5

Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob durch eine Infektion aktivierte (inflammatorische) Makrophagen sich anders verhalten als residente Makrophagen und eine veränderte Zytokinproduktion zeigen. Die Makrophagenaktivierung kann induziert werden, indem eine Peritonitis ausgelöst wird. Dazu wurde den Tieren intraperitoneal Thioglykolat gespritzt. Nach vier Tagen war die akute Phase der Peritonitis mit Überwiegen der Granulozyten beendet, und die chronische Phase der Inflammation mit Überwiegen der Makrophagen trat ein. In dieser Phase wurden den Tieren die Bauchhöhle lavagiert und nach einer sechsständiger Ruhephase die aus der Bauchhöhle gespülten inflammatorischen Makrophagen TLR2-stimuliert (Pam₃Cys) bzw. TLR4-stimuliert (LPS). Anschließend wurde mittels ELISA die Produktion der Zytokine TNF α und IL6 gemessen. Als Kontrolltiere wurden WT-Geschwistermäuse eingesetzt. Die DUSP5-Knockout Mäuse zeigten keine veränderte Zytokinproduktion (Abbildung 21).

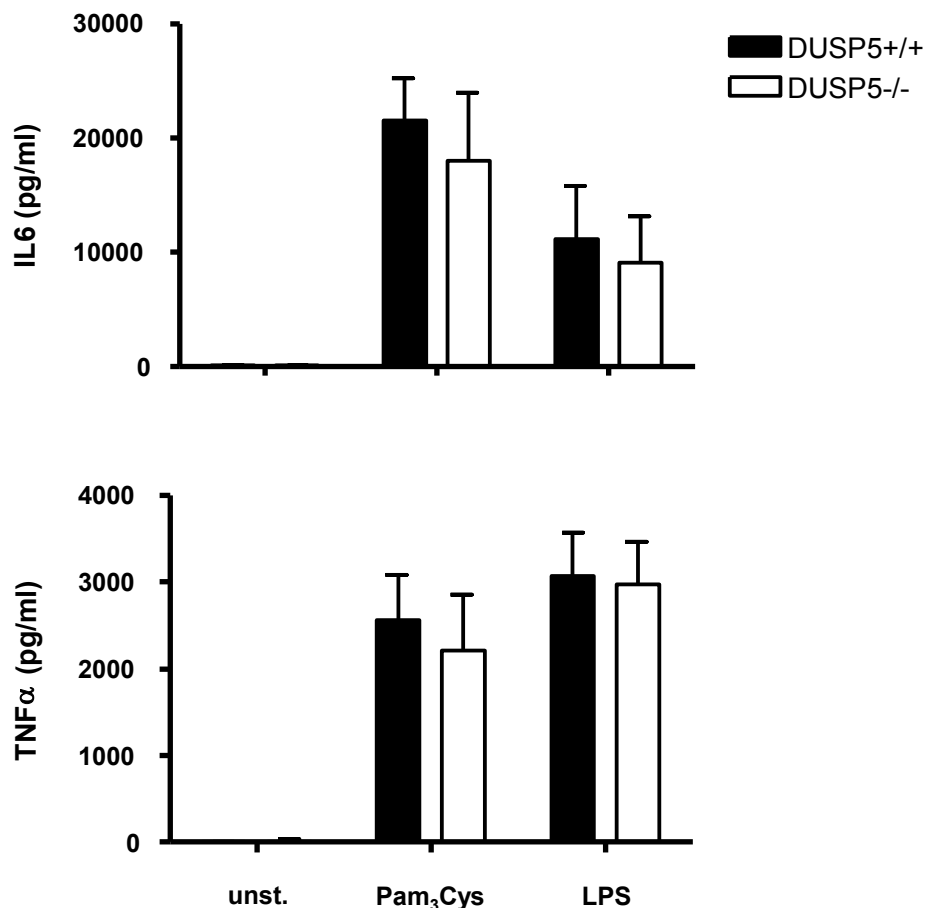


Abbildung 21: DUSP5^{-/-} Makrophagen zeigen keine veränderte TNF α - und IL6-Produktion. ELISA der TNF α - und IL6-Produktion nach LPS [1 μ g/ml] bzw. Pam₃Cys [1 μ g/ml] Stimulation in inflammatorischen DUSP5^{-/-} und WT Makrophagen. Die Zellen wurden über Nacht stimuliert; anschließend wurde die TNF α - bzw. IL6-Produktion im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. n=4-8

4.3.2 Einfluss von DUSP5 auf die B- oder T-Zellentwicklung

Um die Effekte des DUSP5-Verlustes auf die B- und T-Zellentwicklung zu untersuchen, wurden von DUSP5-Knockout- und WT-Mäusen unterschiedliche lymphatische Organe explantiert, homogenisiert und anschließend in Bezug auf spezifische Zellpopulationen mit dem FACS analysiert. Für den jeweiligen nachzuweisenden Zelltyp wurden spezifische FACS-Färbungen etabliert. Dies erfolgte durch den Nachweis spezifischer Antigene, sogenannte *Cluster of Differentiation* (CD) auf der Zelloberfläche die durch monoklonale Antikörper differenziert werden können (Tabelle 11). Auf diese Weise wurde Knochenmark, Milz und Thymus von DUSP5-Knockout und WT-Mäusen untersucht (Abbildung 22). Bei den Mäusen wurde zusätzlich im Hinblick auf eventuell vorhandene inflammatorische Makrophagen eine Peritoneallavage durchgeführt.

Tabelle 11: Aufzählung der im Versuch eingesetzten CDs und ihrer zellulären Reaktivität.

CD Nummerierung	Zelluläre Reaktivität
CD45 (B220)	Leukozyten
CD11b	Monozyten, Neutrophile Granulozyten, NK-Zellen
CD19	B-Zellen
CD69	Früh aktivierte T-, B-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen
CD3	T-Zellen
CD25	Aktivierte T-Zellen, Regulatorische T-Zellen, aktivierte B-Zellen
CD4	T _H 1-Zellen, T _H 2-Zellen
CD8	Zytotoxische T-Zellen
CD62L	B-Zellen, naive T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen
CD44	T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten, Monozyten

Die frühe Entwicklung von B-Zellen findet im Knochenmark statt. Dabei wird IgM bereits früh in der B-Zellentwicklung (Prä-B-Zellen), noch im Knochenmark, exprimiert. Bei der Untersuchung einzelner B-Zellstadien im Knochenmark zeigten die jeweiligen Zellpopulationen keinen Unterschied zwischen DUSP5-Knockout- und WT-Mäusen. Auch die Untersuchung der B-Zellpopulationen in der Milz ergab keine Unterschiede zwischen DUSP5-Knockout- und WT-Mäusen. Auch die Untersuchung der inflammatorischen Makrophagen in der Lavage konnte zwischen den Zellpopulationen der B1- und B2-Zellen

bei DUSP5-Knockout- und WT-Mäusen kein Unterschied festgestellt werden.

Während ihrer Differenzierung im Thymus durchlaufen T-Zellen drei Hauptstadien: DN (doppelnegativ, d.h. die Zellen exprimieren weder CD4 noch CD8), DP (doppelt positiv für CD4 und CD8) und SP (single-positive, entweder CD4 oder CD8). Bei allen drei Stadien konnte zwischen DUSP5-Knockout- und WT-Mäusen kein Unterschied in den jeweiligen Populationsgrößen beobachtet werden.

Die Untersuchung reifer, naiver T-Zellen und aktivierter T-Zellen in der Milz zeigte jedoch, dass DUSP5-Knockout Mäuse eine signifikant erhöhte Anzahl an Effektor/Gedächtnis-T-Zellen besitzen (Abbildung 22).

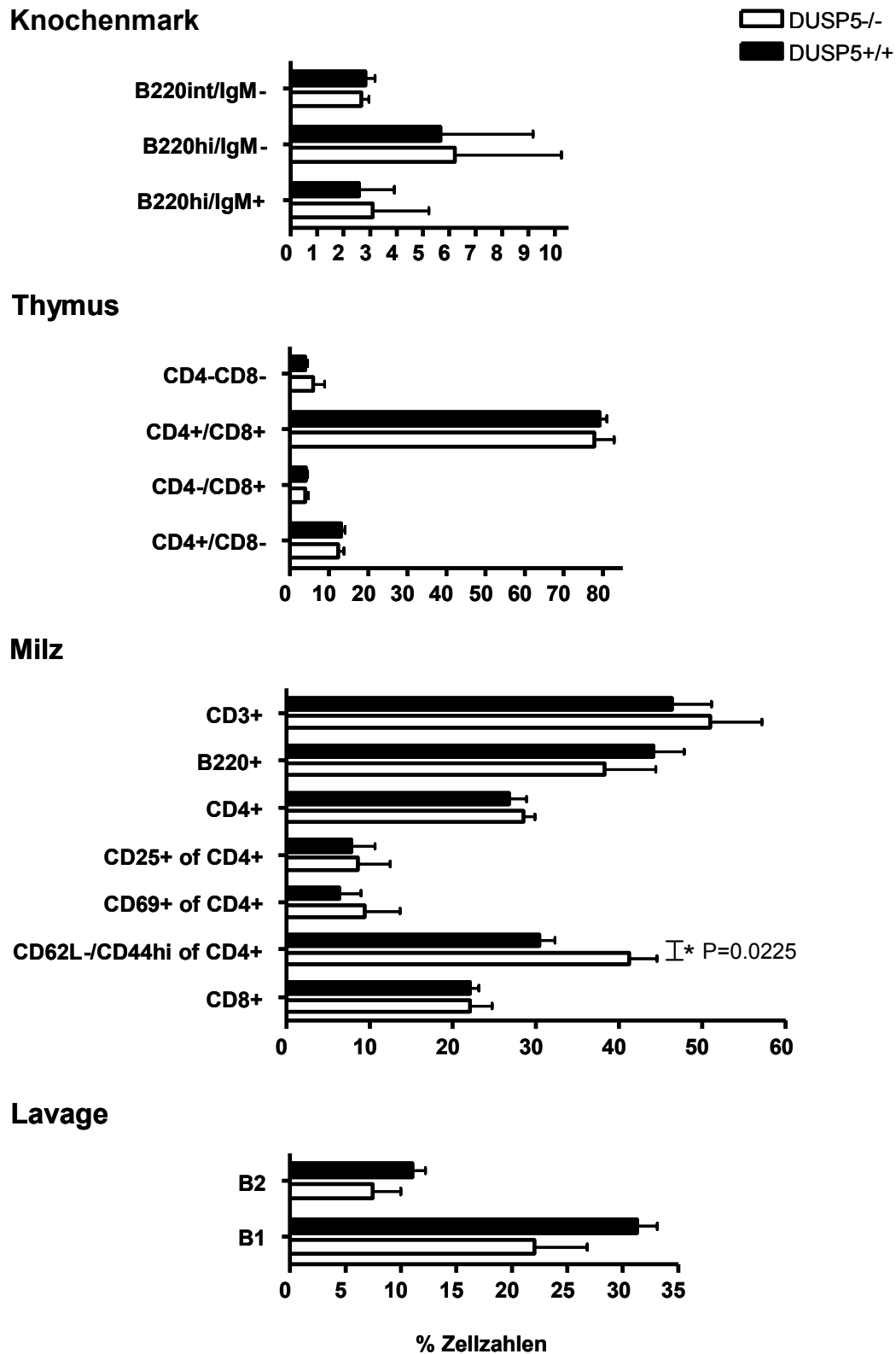


Abbildung 22: DUSP5-Knockout Mäuse zeigen eine signifikant erhöhte Anzahl an Effektor-T-Zellen. FACS-Analyse der unterschiedlichen Zellpopulationen in Milz, Thymus, Knochenmark und Lavage. Die Organe wurden aus DUSP5-Knockout- und WT-Mäusen explantiert, homogenisiert und anschließend in Bezug auf spezifische Zellpopulationen mit dem FACS analysiert. Zusätzlich wurde bei den Mäusen eine Peritoneallavage durchgeführt. Auch diese Zellen wurden mit dem FACS analysiert. n=3

4.3.3 Die Konzentration der Serum-Immunglobuline in DUSP5-Knockout Mäusen ist unverändert

Immunglobuline (Ig) werden auf der Zelloberfläche reifer B-Zellen exprimiert und von Plasmazellen als Antikörper ins Blut abgegeben. Dabei stellen IgGs den größten Anteil der Serum-Immunglobuline und werden in weitere Subklassen unterteilt. Die Konzentration zweier dieser Subklassen (IgG1, IgG2b) und zusätzlich von IgM wurden gemessen. Dazu wurde aus DUSP5-Knockout- und WT-Mäusen Serum gewonnen und mittels ELISA die Konzentration der jeweiligen Immunglobuline bestimmt. Die DUSP5-Knockout-Mäuse zeigten keine veränderten Konzentrationen im Vergleich zu WT-Mäusen (Abbildung 23).

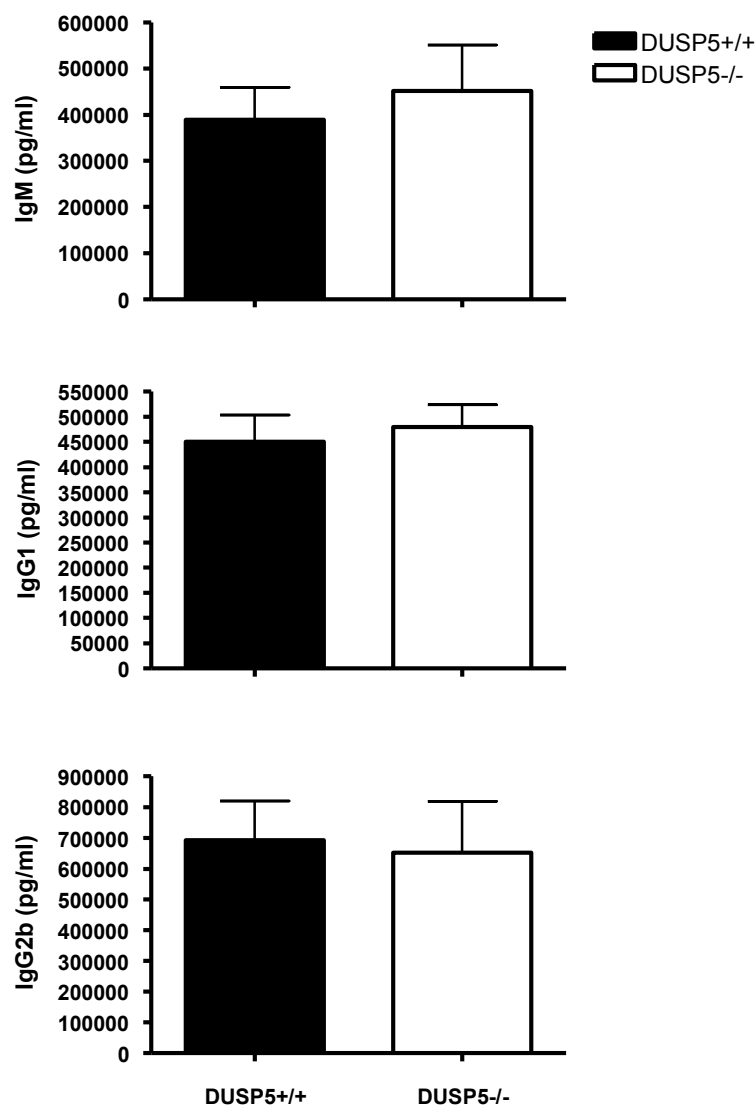


Abbildung 23: Die Konzentration der Serum-Immunglobuline ist in DUSP5-Knockout-Mäusen unverändert. ELISA der IgG1-, IgM- und IgG2b-Konzentration im Serum von DUSP5-Knockout- und WT-Mäusen. n=12

5 Diskussion

Der TLR-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung pathogen-spezifischer Strukturen. Teil dieses Signalweges sind MAPK, deren Regulation mittels Deaktivierung unter anderem durch Phosphatasen erfolgt. Eine Untergruppe der Phosphatasen, die MAPK-spezifischen DUSPs, stellen damit wichtige Regulatoren der Immunantwort dar. Ein Vertreter dieser Gruppe ist DUSP5, dessen Funktion im Rahmen dieser Doktorarbeit genauer untersucht wurde.

Bei der Betrachtung der Funktion von DUSP5 in der Immunantwort wurden drei entscheidende Fragenstellungen genauer untersucht: 1) Welche Signalwege führen zur Induktion der DUSP5-Expression? 2) Welche Proteinstrukturen von DUSP5 sind für die DUSP5-ERK1/2-Funktion essentiell? 3) Welche Rolle spielt die DUSP5-Expression in der Regulation immunologischer Signalwege?

5.1 *In vitro* Analyse der physiologischen Funktion von DUSP5

5.1.1 Die DUSP5 vermittelte Regulation des TLR-Signalweges

Aufgrund des bekannten Zusammenhangs zwischen TLR-vermittelter Immunantwort und verschiedener DUSPs sollte in den folgenden Experimenten im Speziellen die Rolle von DUSP5 bei der Regulation der Immunantwort genauer untersucht werden.

Zur Untersuchung der Induzierbarkeit von DUSP5 wurde ein Promoter-Assay etabliert, bei dem der murine DUSP5-Promoterbereich transient exprimiert und mit Pam₃Cys und CGRP stimuliert wurde. Hierzu wurden drei verschieden lange Promoterfragmente (-1.000 bp, -600 bp und -400 bp) jeweils in drei separaten Expressionssystemen untersucht (pGL3-Basic, pGL3-Enhancer, pGL3-Promoter, jeweils in HEK293-Zellen exprimiert). Lediglich das -1.000 bp-Fragment im pGL3-Promoter-Vektor (einziger Vektor mit einem zusätzlichen SV40 Promoter) zeigte eine schwache (1,5-fach) Induktion des DUSP5-Promoters nach TLR2-Stimulation mit Pam₃Cys bzw. mit CGRP und Pam₃Cys. Die kürzeren Fragmente waren in allen drei Vektorsystemen nicht reproduzierbar zu induzieren (siehe Abbildung 7).

Die nur schwache Induzierbarkeit des natürlichen DUSP5-Promoters ist insofern zu hinterfragen, da aufgrund des eingesetzten Testsystems (vielfache Vektorkopien pro Zelle) von einer stärkeren Induktion auszugehen wäre. Diese könnte zwar unter Umständen auch durch mehrmalige Klonierung des DUSP5-Fragmentes in den Expressionsvektor verstärkt werden, liegt aber wahrscheinlich eher in der Konstitution der eingesetzten HEK293-Zelllinie begründet. Diese besitzt keinen natürlichen TLR2-Rezeptor, d.h. dieser musste zusätzlich transfiziert werden, was durch die parallele Transfektion mit dem Vektor pFlag-TLR2 sichergestellt werden sollte. Da der Signalweg jedoch noch weiterer Proteine bedarf, ist hier möglicherweise eine der Ursachen für die niedrige Induzierbarkeit des DUSP5-Promoters im eingesetzten Expressionssystem zu suchen. Zur weitergehenden Untersuchung der Promoterfunktion wäre daher eine Etablierung der Promoter-Assays in Makrophagen interessant, da hier eine TLR-vermittelte Zytokinexpression bereits nachgewiesen werden konnte und somit anzunehmen ist, dass der vollständige Signalweg exprimiert wird. Andererseits ist nicht mit Sicherheit zu sagen, dass TLR2 der Hauptweg der DUSP5-Induktion ist – auch wenn, wie in Abbildung 7 gezeigt, eine Induktion sicher nachgewiesen werden konnte. Somit fehlen dem eingesetzten artifiziellen Testsystem möglicherweise essentielle Komponenten des Induktionsweges, um den Promoter ausreichend zu aktivieren.

Eine spezifischere Untersuchung des DUSP5-Promoters wäre weiterhin durch Mutation einzelner putativer Sequenzelemente (CREB- bzw. NF- κ B-Bindestellen, SRE, STAT5) möglich. Mithilfe dieser mutierten Promoterbereiche könnten essentielle Transkriptionsfaktorbindestellen detektiert werden. Bindestudien mit den so identifizierten Bindestellen würden dann zeigen, welche Proteine an den DUSP5-Promoter binden und dessen Transkription beeinflussen. Eines dieser noch unbekannt Proteine vermittelt die CGRP-Aktivierung, da wie in Abbildung 7 dargestellt, auch mit CGRP eine schwache Induktion festgestellt wurde. Der genaue Signalweg ist dabei unbekannt, findet jedoch unter Beteiligung von cAMP statt (31). Dass eine weitere experimentelle Untersuchung der DUSP5-Promoterregion wichtig ist und von der computerbasierten Analyse von Sequenzbindestellen abweicht, konnte mit den hier durchgeführten Experimenten gezeigt werden. So konnte sowohl bei CGRP- als auch bei Pam₃Cys-Stimulation beim verkürzten (-600bp)-Fragment keine Induktion mehr beobachtet werden, obwohl alle putativen CREB- und NF- κ B-Bindestellen vorhanden waren. Die schwache Induzierbarkeit des DUSP5-Promoters könnte aber auch dadurch erklärt werden, dass funktionell wichtige Promoterelemente nicht im klonierten Fragment enthalten sind.

5.1.2 Die DUSP5-Expression in Immunzellen

Zur Untersuchung der Auswirkung einer verstärkten DUSP5-Expression auf den TLR-Signalweg wurden Makrophagen generiert, die zusätzlich zum endogenen DUSP5 transfiziertes DUSP5 stabil exprimierten. Die Anzahl der zusätzlich integrierten DUSP5-Kopien wurde dabei nicht bestimmt und kann somit bei den einzelnen Klonen variieren. Da die Etablierung einer PCR zur Amplifikation des codierenden Bereiches von DUSP5 (mithilfe aus RNA gewonnener cDNA) nicht erfolgreich war, wurde die Sequenz Codon-optimiert synthetisiert. Anschließend wurde die Sequenz in den Expressionsvektor kloniert und mittels Transfektion in RAW 264 Makrophagen integriert. Vorversuche mit Makrophagen zeigten, dass keiner der kommerziell erhältlichen DUSP5-spezifischen Antikörper sensitiv genug war endogenes DUSP5 im Western Blot nachzuweisen. Auch die eigene Generierung eines polyklonalen Antikörperserums gegen ein Epitop aus 16 Aminosäureresten der DUSP5-Primärstruktur (DUSP5 Rabbit polyclonal Antibody 5552) führte zu keiner erhöhten Sensitivität. Die schwere Nachweisbarkeit von DUSP5 liegt wahrscheinlich an der niedrigen DUSP5-Expression in Makrophagen (38) und der selbst nach Induktion geringen Halbwertszeit (45 Minuten) von DUSP5 (85). Um dennoch einen spezifischen Nachweis von überexprimiertem DUSP5 sicherzustellen, wurde bei der Generierung der einzelnen Makrophagenzelllinien ein Flag-Tag an das DUSP5-Gen angehängt. Dieser ermöglicht neben der DUSP5- auch die Flag-Tag-Detektion. Im Falle von zu schwach ausgeprägten Signalen des DUSP5-spezifischen Antiserums konnte somit über das polyklonale Antiserum gegen das Flag-Tag-Epitop ein unabhängiger Nachweis der DUSP5-Überexpression erfolgen. Da der parallele Nachweis über die DUSP5-spezifischen Antikörper und die Flag-Tag-spezifischen Antikörper im Überexpressionssystem letztendlich zeigte, dass die DUSP5-spezifischen Antikörper ausreichend sensitiv waren, wurde in den weiteren Western Blot-Experimenten lediglich mit DUSP5-spezifischen Antikörpern gearbeitet, auch wenn das Expressionskonstrukt weiterhin den C-terminalen Flag-Tag enthielt.

Die überexprimierenden Makrophagen zeigten im Vergleich zu nicht überexprimierenden Klonen in mehreren unabhängigen Experimenten nach TLR2-Stimulation eine hochsignifikant verstärkte IL6- und TNF α -Produktion (Abbildung 8). Dies lässt vermuten, dass der TLR2-Signalweg über die Expression von DUSP5 positiv reguliert wird. Da das Substrat von DUSP5, ERK1/2, am TLR-Signalweg beteiligt ist, sollte in weiteren Experimenten die ERK1/2-DUSP5-Interaktion untersucht werden.

Die Aktivierung der Zellen der erworbenen Immunantwort erfolgt über spezifisch auf das jeweils anwesende Antigen reagierende Rezeptoren über deren klonale Expansion. Dadurch wird die Zellzahl mit demselben Erkennungsrezeptor (TCR oder Oberflächen Ig) und damit die Chance auf ein spezifisches Antigen zu treffen, erhöht. Die aktivierten Zellen (B- und T-Zellen) entwickeln daraufhin ihre funktionalen Aktivitäten. Im Gegensatz dazu haben Zellen der angeborenen Immunantwort (Makrophagen, DCs, Neutrophile) dieselben Rezeptoren. Sobald diese mit dem Antigen interagieren, stoppen sie die Proliferation und werden aktiviert (109). In den Zellen der angeborenen Immunantwort sind Proliferation und Aktivierung somit sich gegenseitig ausschließende Aktivitäten. Erstaunlicherweise findet bei beiden Prozessen eine ERK1/2-Aktivierung statt. Diese erfolgt jedoch scheinbar mit unterschiedlichen Kinetiken (110). Die Dauer der ERK1/2-Aktivierung und damit dessen Phosphorylierung scheint zwischen Proliferation und Aktivierung zu unterscheiden. Die Spezifität und die biologischen Konsequenzen einer ERK1/2-Stimulation können somit durch strenge Kontrolle der Dauer, der Stärke und der Lokalisation des ERK1/2-Signales erreicht werden (111) (112). Damit stellt die ERK-Aktivität und dessen Regulation eine Schlüsselstelle für das Verständnis der angeborenen Immunantwort dar. Da DUSP5 als ERK1/2-spezifische Phosphatase bekannt ist (41), kann folglich ebenfalls ein Zusammenhang mit der Regulation der angeborenen Immunantwort angenommen werden.

Interessanterweise zeigten DUSP5-überexprimierende Makrophagen nach TLR2-Stimulation in einer Kinetik über einen Zeitraum von 60 Minuten trotz verstärkter TNF α -Produktion keine verminderte ERK1/2-Phosphorylierung (Abbildung 9). Dies konnte mit zwei unabhängigen Klonen gezeigt werden. Auf die Messung an späteren Zeitpunkten wurde bewusst verzichtet, da bereits in früheren Studien in Northern Blots (113) ein Peak für die maximale Induktion bei ca. 1 Stunde nach Stimulation festgestellt wurde.

Ein weiterer Hinweis, dass die DUSP5-vermittelte ERK1/2-Regulation und die TNF α -Produktion möglicherweise ohne Beteiligung der Phosphatase-Aktivität vermittelt werden, fand sich bei der systematischen Suche von Proteinen, die spezifisch funktionale DNA-Sequenzen binden. Hierbei wurde ERK2 als transkriptioneller Repressor des proinflammatorischen Zytokines IFN γ identifiziert. Diese Repression ist *in vivo* GAAAC-Konsensussequenz vermittelt (114). Auch das murine TNF α -Gen enthält in seiner Promoterregion eine GAAAC-Sequenz. Somit könnte analog zu IFN γ das ERK2-Protein als Repressor von TNF α wirken und würde die o.g. Ergebnisse (Abbildung 9) insofern erklären,

dass durch Bildung eines DUSP5-ERK1/2-Komplexes der Zugang des Repressors ERK2 zur Konsensussequenz verhindert würde. DUSP5 wäre somit ein De-Repressor des Repressors ERK2. Für IFN γ konnte gezeigt werden, dass die ERK2-vermittelte Repression ohne Beteiligung der ERK2-Kinase-Aktivität stattfindet (114). Aufgrund dieser Überlegungen könnte analog dazu für TNF α ein ähnlicher Mechanismus wirken.

Deshalb sollte die Hypothese von einer DUSP5-Phosphatase-Aktivität unabhängigen ERK1/2-Deaktivierung untersucht werden. Dazu wurden wie in 4.1.3.3 beschrieben Makrophagen generiert, bei denen durch C263S-Austausch katalytisch inaktives DUSP5 überexprimiert wird. Die Untersuchung mehrerer unabhängiger Klone ergab, dass Makrophagen, die katalytisch inaktives DUSP5 überexprimieren, im Vergleich zur DUSP5 endogen exprimierenden Kontrolle eine erhöhte TNF α -Produktion zeigten (Abbildung 10) und lieferten damit einen starken Hinweis, dass die TNF α -Expression tatsächlich unabhängig von der Phosphatase-Aktivität von DUSP5 sein könnte. Analog dazu ergab die Untersuchung derselben Klone ebenfalls keine verminderte IL6-Produktion. Dies legt nahe, dass die IL6-Expression auf dieselbe oder ähnliche Weise wie die TNF α -Expression reguliert wird.

Ein weiteres entscheidendes Kriterium für die Funktionalität einer Phosphatase ist deren zelluläre Lokalisation. Da DUSPs sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern aktiv sein können, sollte untersucht werden, inwieweit die zelluläre Lokalisation von DUSP5 Einfluss auf dessen regulatorische Aktivität hat. Durch Phosphorylierung aktiviertes ERK1/2 kann eine große Anzahl unterschiedlicher Proteine im Zytoplasma phosphorylieren, meistens jedoch führt die Aktivierung zu der Translokation von ERK1/2 in den Zellkern wo es die Expression vieler *immediate early* Gene vermittelt (115) (116) (117) (118) (119). Damit wäre neben der Dauer der ERK1/2-Aktivität auch die Lokalisation von ERK1/2 ausschlaggebend für den nachfolgenden Signalweg.

Es stellte sich daher die Frage, inwieweit die Lokalisation von DUSP5 Einfluss auf ERK1/2 hat. Hierauf hin wurden mehrere Makrophagenzelllinien untersucht, die aus unabhängigen Klonen generiert wurden und DUSP5 mit mutiertem NLS überexprimieren. Hier zeigte sich nach TLR2-Stimulation eine gleiche oder möglicherweise leicht erhöhte TNF α -Produktion im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 10). Die im gleichen Experiment durchgeführte Überexpression von unmutiertem DUSP5 ergab wie zuvor beschrieben wieder ein signifikant erhöhtes TNF α -Signal. Diese Ergebnisse unterstützen die zuvor beschriebene De-Repressorhypothese: DUSP5 wird nicht mehr in den Zellkern transloziert und kann daher

nicht als De-Repressor des Repressors ERK1/2 wirken, die TNF α -Produktion ist inhibiert. Diese Hypothese unterstützt außerdem die Annahme, dass die Lokalisation von DUSP5 entscheidend für dessen Aktivität ist und DUSP5 im Zytoplasma nicht aktiv ist. Hinweise darauf, dass DUSPs (DUSP2, DUSP4, DUSP5) eventuell sogar die Lokalisation von ERK und damit dessen Aktivität beeinflussen, liefern Transfektionsexperimente von Caunt *et al.* die zeigten, dass bei einer verminderten DUSP-ERK-Bindung (vermittelt durch ERK-Mutation) neben einer verstärkten ERK2-Kinaseaktivität auch eine reduzierte nukleäre Anhäufung von ERK2 stattfindet (59).

Eine mögliche Erklärung warum bei Zellen mit mutierter NLS dennoch eine leicht erhöhte TNF α Expression zu beobachten ist, könnte die Kristallstruktur von DUSP5 liefern. So zeigt die Kristallstruktur der katalytischen Domäne von DUSP5, dass eine *head-to-tail* Dimerbildung stattfindet (120). Diese scheint unter Berücksichtigung bereits bekannter DUSP Kristallstrukturen für DUSP5 einzigartig zu sein und lässt folglich für DUSP5 auf einen gesonderten Mechanismus der Substraterkennung schließen. Dies würde erklären, warum Zellen mit ausgeschaltetem NLS von DUSP5 im Vergleich zur Kontrollzelllinie nach TLR2-Stimulation leicht mehr TNF α produzierten: durch Dimerbildung von DUSP5 mit mutierter NLS und endogenem DUSP5 könnte mutiertes DUSP5 in den Zellkern gelangen und aufgrund der insgesamt erhöhten Menge an DUSP5 (mutiert und endogen) sogar ein stärkeres Signal liefern als nur mit endogenem DUSP5.

Aufgrund der *in vitro* Ergebnisse könnte zusammenfassend folgende Hypothese (Abbildung 24) eine physiologische Funktion von DUSP5 bei der TLR-vermittelten angeborenen Immunantwort erklären.

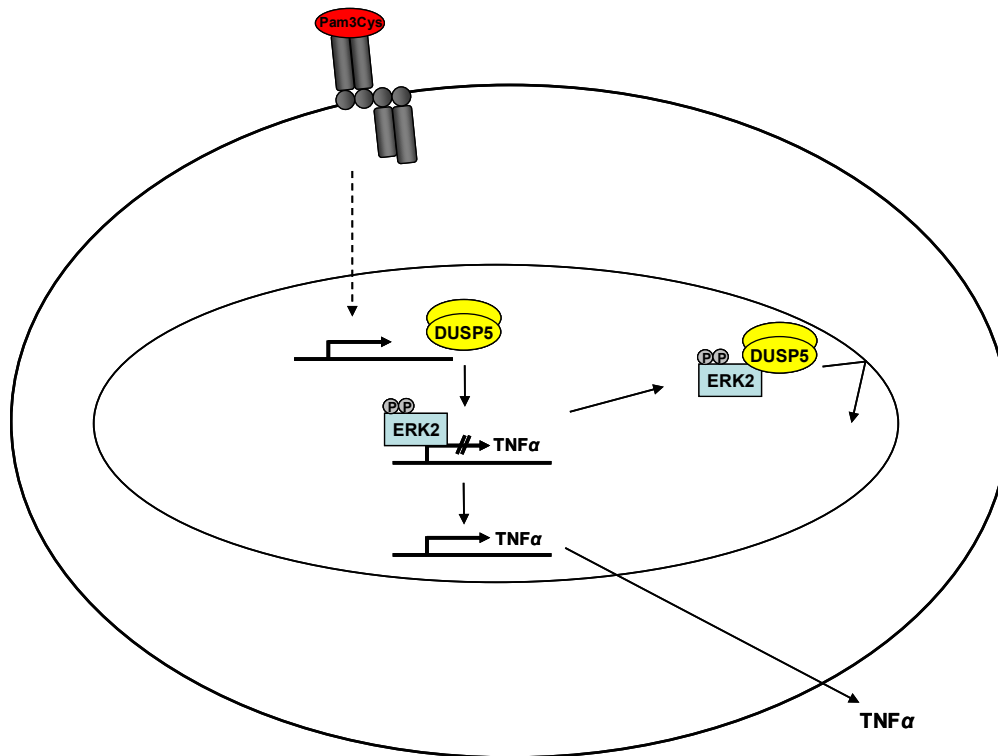


Abbildung 24: Hypothese zur Rolle von DUSP5 bei der Regulation der Zytokinproduktion. Der DUSP5-Promoter kann u.a. durch TLR-vermittelte Pam₃Cys-Stimulation induziert werden, wobei eine verstärkte DUSP5-Expression zu einer vermehrten Produktion von TNF α führt. ERK2 ist der Repressor der TNF α -Transkription. Diese ist unabhängig von der Kinaseaktivität von ERK2. Die Repression wird über eine Konsensussequenz vermittelt die sich auch im TNF α -Promoter findet. DUSP5 interagiert stabil mit ERK (41) (59) und fungiert so als De-Repressor des Repressors ERK2. Durch die Bildung des stabilen DUSP5-ERK2-Komplexes wiederum wird ERK2 im Zellkern gehalten, was dessen zytosolische Funktionen hemmt.

Einen weiteren Hinweis, dass DUSP5 an der Regulation der angeborenen Immunantwort beteiligt sein könnte, liefern Experimente, bei denen Mäuse nach Infektion mit starker Bakterieninfiltration (Sepsismodell) eine anhaltend erhöhte DUSP5-Expression (mRNA) in der Milz und der Leber zeigten (Abbildung 6). Dies könnte in sofern von Bedeutung sein, da in der Leber die Synthese von Akut-Phase-Proteinen stattfindet, welche eine für die Aktivierung der unspezifischen Immunantwort wichtige Akutphase-Reaktion auslösen. Eine wichtige Rolle spielen dabei unter anderem Makrophagen, die durch Freisetzung von IL6 und weiteren Interleukinen und anderen Botenstoffen in die Blutbahn eine vermehrte Cortisol-vermittelte Synthese von Akut-Phase-Proteinen bewirken. Zusammen mit der zuvor beschriebenen Beobachtung, dass in DUSP5-überexprimierenden Makrophagen nach TLR2-Stimulation ein signifikanter Anstieg von IL6 beobachtet wurde, ergeben sich hier Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen DUSP5-Expression, verstärkter IL6-Expression und der Entwicklung einer Sepsis.

Bei einer schweren Sepsis ist die Leistungsfähigkeit lebenswichtiger Organe herabgesetzt. Dies kann zu Lungenversagen, Nierenversagen, Veränderungen im Blutgerinnungssystem und damit einhergehend zu beeinträchtigter Sauerstoffversorgung dieser Organe führen. Aber auch veränderte Leberfunktionen (Gelbsucht) und die Veränderung des Blutzuckers ("Hyperglykämie", "Hypoglykämie") können folgen und somit binnen weniger Tage, ja sogar Stunden, zum Zusammenbruch des Kreislaufs, zum Multiorganversagen und schließlich zum Tode führen. Alleine in Deutschland sterben jährlich rund 60.000 Menschen an den Folgen einer Sepsis (121). Ausgangspunkt einer Sepsis ist dabei eine als *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) bezeichnete, generalisierte hyper-inflammatorische Reaktion infolge einer Infektion. Es kommt hierbei bei den durch Pathogene induzierten intrazellulären Signalwegen zu einer Dysregulation pro- und anti-inflammatorischer Zytokine, was eine Überreaktion des Immunsystems zur Folge hat. Infolge der exzessiven Produktion von in erster Linie pro-inflammatorischen Zytokinen (z.B. $TNF\alpha$, $IL1\beta$, $IL6$) kommt es zu einer dysregulierten angeborenen Immunantwort (77) (78).

Dadurch besteht die Möglichkeit bereits zu Beginn einer Infektion Aussagen über den möglichen Verlauf einer Infektion zu treffen. So ist beim Menschen eine frühe hohe $IL6$ -Produktion mit erhöhter Letalität infolge einer schweren Sepsis korreliert (122). $IL6$ kann daher als früher (bereits nach wenigen Stunden) Indikator für das Ausmaß einer Entzündung betrachtet werden und ist mit einer Halbwertszeit von 45 Minuten gut geeignet akute Entzündungsantworten zu untersuchen. In der Medizin wird $IL6$ daher als Biomarker zur Diagnose des Schweregrades einer Infektion eingesetzt (Siemens Healthcare Diagnostics). Alle diese Ansätze ermöglichen zwar eine bessere und frühe Diagnose, aber nur das Erforschen der komplexen molekularen Signalwege kann ein Verständnis und damit eine Ansatz zur Behandlung einer Sepsis geben.

Mithilfe von Mausmodellen konnte bereits für mehrere DUSPs eine Beteiligung an der Sepsis festgestellt werden. So reguliert DUSP4 die Entzündungsantwort in der Sepsis indem es, eventuell über Inhibierung der ERK-vermittelten DUSP1 Induktion als positiver Regulator der Immunantwort wirkt (81). DUSP1 vermittelt eine dynamische Regulation pro- und anti-inflammatorischer Zytokine bei der Immunantwort (123) und spielt dadurch eine essentielle Rolle in der negativen Kontrolle der angeborenen Immunantwort indem es z.B. einen Teil der LPS-induzierten Gene induziert und Mäuse dadurch vor dem endotoxischen Schock schützt (124).

5.2 Generierung und Charakterisierung einer DUSP5-Knockout Maus

Der gezielte Genfunktionsverlust im Säugermodell stellt ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung von Genfunktionen dar. Besonders bei den komplexen, miteinander interagierenden Signalwegen der angeborenen und adaptiven Immunantwort lassen sich Ergebnisse von *in vitro* Experimenten aufgrund redundanter Funktionsmechanismen verschiedener Signalmoleküle oft nur schwer oder gar nicht interpretieren und spiegeln aufgrund ihres oft stark artifiziellen Charakters die komplexe Situation im lebenden Organismus nicht exakt wider. So zeigen mehrere DUSPs bei *in vitro* Experimenten eine sehr viel geringere Substrat-Spezifität gegenüber den einzelnen MAPK als im Knockout-Modell. Ein Beispiel dafür stellt DUSP1 dar. DUSP1 dephosphoryliert bei *in vitro* Experimenten die drei MAPK p38, JNK und ERK1/2 (42) (74) während Studien mit Makrophagen aus DUSP1 Knockout Mäusen zeigten, dass hauptsächlich p38 Substrat von DUSP1 ist (125) (76) (124).

Um diese Problematik zu umgehen, wurde eine DUSP5-Knockout-Mauslinie generiert. Über das Cre/lox-System kann DUSP5 konditional entweder im gesamten Organismus oder selektiv in bestimmten Geweben durch Deletion des Exons 1 ausgeschaltet werden.

5.2.1 Generierung einer konditionalen DUSP5-Knockout Maus

Der bei der Generierung eingesetzte Inaktivierungsvektor wies konstruktionsbedingt drei *loxP*-Sequenzen auf, obwohl zur sicheren Inaktivierung eines definierten Genabschnitts lediglich zwei solcher Sequenzen flankierend zu der zu deletierenden Sequenz notwendig sind (Abbildung 16). Die Anwesenheit der drei *loxP*-Sequenzen im mutierten Allel ergab statistisch betrachtet drei Möglichkeiten der Rekombination: (1) Zwischen den beiden äußeren *loxP*-Sequenzen, (2) zwischen der ersten und zweiten *loxP*-Sequenz und (3) zwischen der zweiten und dritten *loxP*-Sequenz.

Die Möglichkeit (1) stellt die angestrebte Rekombination dar, da hierbei sowohl Exon 1 als auch die Neomycinresistenzkassette deletiert werden. Bei dieser Rekombination wird kein DUSP5 mehr transkribiert und als einzige zusätzliche Sequenz im Genom bleibt eine *loxP*-Sequenz (34bp) im ursprünglichen Intron nach Exon 1 zurück. Die Möglichkeit (2) führt ebenfalls zur Deletion des DUSP5 Exons 1, die Neomycin-Resistenzkassette bleibt dagegen erhalten. Unter diesen Umständen ist, da der Syntheseabbruch des *dusp5*-Genes vor der Neomycinresistenzkassette stattfinden sollte ebenfalls keine Expression von DUSP5 mehr zu erwarten. Es verbleibt jedoch die Neomycin-Resistenzkassette im Genom zurück, was im

Zweifelsfall im Vergleich zu reinen Nullmutante zu nicht einfach zu interpretierenden Effekten führen könnte und daher nicht angestrebt wurde. Bei Möglichkeit (3) würde ausschließlich die Neomycin-Resistenzkassette deletiert. Aufgrund dessen würde DUSP5 noch normal exprimiert werden, was im Prinzip einer Reversion zum Wildtyp entspräche. Die Möglichkeiten (2) und (3) mussten somit bei der Selektion der richtigen Klone ausgeschlossen werden. Der Nachweis der ersten der oben genannten Varianten in dem erzeugten Mausstamm erfolgte durch spezifische PCRs (Abbildung 17 und Abbildung 18).

Die Generierung der jeweiligen Mausstämme erfolgte durch Kreuzung des geflochten Mausstammes mit Mauslinien, die unter der Kontrolle von zelltyp-spezifischen Promotoren die Cre-Rekombinase exprimieren. Mit dieser Methode kann DUSP5 in definierten Zellpopulationen deletiert werden. Auf diese Weise wurden Mauslinien generiert, die in myeloiden Zellen kein DUSP5 mehr exprimieren. Es wurde mittels qRT-PCR aus Makrophagen der so generierten Mäuse nachgewiesen, dass diese Tiere kein DUSP5 mehr exprimieren (Abbildung 19). Daneben wurde aber auch mit Mäusen, die die Cre-Rekombinase im gesamten Organismus exprimieren, ein ubiquitärer DUSP5-Knockout generiert.

5.2.2 Charakterisierung der DUSP5-Knockout Maus

5.2.2.1 Makroskopische und zelluläre Charakterisierung von nicht aktivierten DUSP5-Knockout-Mäusen

Sowohl beim Zelltyp-spezifischen als auch beim ubiquitären DUSP5-Knockout entwickelten sich die generierten Mausstämme normal, zeigten makroskopisch keine Anomalien, waren fertil und zeigten eine normale Mendel'sche Ratio. Dies lässt den Schluss zu, dass DUSP5 keine essentielle Funktion bei der embryonalen Mausentwicklung hat.

Die Charakterisierung der phänotypisch normal entwickelten Tiere wurde im weiteren Verlauf auf wichtige Immunorgane (Milz, Thymus, Lymphknoten) fokussiert. Auch auf organischer Ebene konnten dabei keine Anomalien bei der Entwicklung dieser Organe festgestellt werden. Daher wurden diese Organe auf zellulärer Ebene genauer untersucht. Hier wurden bei der ubiquitären DUSP5-Knockout Maus mittels spezifischer Zellfärbungen im Durchflusszytometer die Populationen einzelner Immunzellen und deren Entwicklungsstadien untersucht.

In den frühen Entwicklungsstadien von B-Zellen im Knochenmark konnte bei den einzelnen B-Zelltypen kein Unterschied zwischen DUSP5-Knockout- und WT-Mäusen festgestellt werden. Dasselbe gilt für die B-Zellpopulationen in der Milz. Auch die Untersuchung von aus der Bauchhöhle isolierten Makrophagen zeigte zwischen den Zellpopulationen der B1- und B2-Zellen bei DUSP5-Knockout- und WT-Mäusen keinen Unterschied (Abbildung 22). Teil der adaptiven Immunantwort und damit Indikatoren für ein aktiviertes adaptives Immunsystem sind Immunglobuline auf der Zelloberfläche reifer B-Zellen oder von B-Zellen sezerniert als Antikörper im Blut. Dabei stellen IgGs den größten Anteil der Serum-Immunglobuline und werden in weitere Subklassen unterteilt. Die Konzentration zweier Subklassen der IgGs (IgG1, IgG2b) und zusätzlich IgM wurden gemessen (Abbildung 23). Die DUSP5-Knockout Mäuse zeigten keinen veränderten Konzentrationen an Serum-Immunglobulinen im Vergleich zu WT-Mäusen. Dies zeigt, dass die B-Zellentwicklung und die Produktion von Immunglobulinen, zumindest beim nicht aktivierten Immunsystem, vermutlich ohne Beteiligung von DUSP5 stattfinden.

Auch die Entwicklung und Differenzierung der T-Zellen wurde mithilfe spezifischer Zellfärbungen untersucht. Dabei konnte zwischen den jeweiligen Populationsgrößen der sich im Thymus differenzierenden T-Zellen kein Unterschied zwischen DUSP5-Knockout- und WT-Mäusen beobachtet werden (Abbildung 22). Dies ist eine interessante Beobachtung, da bei DUSP5 überexprimierenden transgenen Mäusen die T-Zellentwicklung im doppelt-positiv Stadium blockiert ist (126). Diese ERK1/2-vermittelte Blockade wird durch weitere Studien bestätigt, in denen gezeigt werden konnte, dass ERK1/2 eine wichtige Funktion bei der positiven T-Zellselektion hat (127) (128). Entgegen der DUSP5-Überexpression nimmt der DUSP5-Verlust also keinen Einfluss auf die positive T-Zellselektion.

Die weitere Untersuchung von einfach-positiven T-Zellen erfolgte mithilfe von aus der Milz isolierter Zellen. Naive CD4 T-Zellen exprimieren nach Antigenkontakt die Aktivierungsmarker CD69 und CD25. Bei der Untersuchung dieser beiden Marker konnte zwischen DUSP5-Knockout- und WT-Mäusen kein Unterschied festgestellt werden. Die aktivierten T-Zellen entwickeln sich zu Gedächtnis-T-Zellen. Bei der weiteren Entwicklung können diese in unterschiedliche Phänotypen differenzieren. Dabei exprimieren sowohl prä- T_H1 - als auch prä- T_H2 -T-Zellen CD62L. Bei der weiteren Differenzierung zur T_H -Effektor-T-Zelle (T_H1 und T_H2) wird die CD62L-Expression jedoch herunterreguliert und ermöglicht damit den Lymphozyten die zentralen lymphatische Organe zu verlassen und in der Peripherie zu migrieren wo sie u.a.

Makrophagen (T_H1) und B-Zellen (T_H2) aktivieren. Die Untersuchung ergab, dass die DUSP5-Knockout Maus signifikant mehr Effektor-T-Zellen ($CD62L^+/CD44^{high}$) besitzt (Abbildung 22). Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass DUSP5 als De-Aktivator von ERK1/2 eine wichtige Funktion bei der Differenzierung der Gedächtnis-T-Zellen zu Effektor-T-Zellen einnimmt. Die genauere Untersuchung dieser molekularen Zusammenhänge zwischen DUSP5-Expression und T-Zellentwicklung bzw. T-Zelldifferenzierung findet im Rahmen weiterführender Arbeiten statt.

Bei allen diesen Untersuchungen muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Immunsystem der Mäuse nicht aktiviert war und damit nur die Entwicklung der einzelnen Zellpopulationen bei gesunden Mäusen untersucht wurde. Es kann bei dieser Betrachtung noch nicht ausgeschlossen werden, dass DUSP5 erst bei der Aktivierung des Immunsystems durch eine auftretende Infektion eine regulatorische Rolle spielt. Die Untersuchung des aktivierten Immunsystems in der lebenden Maus wie z.B. im CASP Sepsismodell kann erst bei Tieren durchgeführt werden die über mehrere Generationen ($n=10$) auf eine Inzucht-Mauslinie zurückgekreuzt wurden. Erst dann kann von einem identischen genetischen Hintergrund der Versuchstiere ausgegangen werden und Effekte aufgrund eines unterschiedlichen genetischen Hintergrunds können ausgeschlossen werden. Zum Zeitpunkt der hier durchgeführten Untersuchungen existierte diese Rückkreuzung ($n=10$) noch nicht. In den durchgeführten Experimenten wurde ein Einfluss des genetischen Hintergrunds ausgeschlossen, indem ausschließlich WT-Geschwisterkontrolltiere und als zusätzliche Kontrolle C57BL/6-Mäuse verwendet wurden.

Bei den darauffolgenden Experimenten wurde untersucht, inwieweit der DUSP5-Verlust nach Aktivierung von Makrophagen zu einer veränderten Reaktion führt. Dazu wurden in Makrophagen aus DUSP5-Knockout-Mäusen nach TLR-Stimulation die Zytokinproduktion gemessen. Hierzu wurden Mäuse verwendet, bei denen DUSP5 nur in myeloiden Zellen deletiert war (4.2.3). Der Vorteil von Mäusen, bei denen der DUSP5-Verlust auf myeloide Zellen beschränkt ist liegt darin, dass alle anderen Körperzellen DUSP5 normal exprimieren. Dadurch kann der Verlust in einzelnen Zelltypen spezifisch untersucht werden, da kompensatorische Effekte anderer Zelltypen ausgeschlossen werden können. Zellinterne kompensatorische Effekte die eventuell von anderen DUSPs vermittelt werden können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Diese könnten in diesem Zusammenhang durchaus auftreten, da es nach derzeitigen Kenntnisstand mindestens 14 DUSPs gibt, die *in vitro* ERK, p38 und/oder

JNK regulieren (38) und mit Ausnahme von DUSP5 jeweils mit mehreren MAPK interagieren. Dies zeigt, dass das Wirkungsspektrum von DUSPs durchaus redundant sein könnte. Knochenmarksgenerierte *ex vivo* Makrophagen aus Mäusen mit myeloiden DUSP5-Verlust zeigten nach TLR2-Stimulation (Pam₃Cys) im Vergleich zu WT-Geschwistertieren keine veränderte IL6- und TNF α -Produktion (Abbildung 21). Zwar ist sowohl bei Knockout- als auch bei den Kontrollzellen nach Stimulation ein Anstieg von IL6 deutlich zu erkennen- bei unstimulierten oder nur für zwei Stunden stimulierten Makrophagen ist keine IL6-Produktion nachweisbar- werden die Zellen jedoch länger stimuliert, zeigen beide eine starke IL6-Produktion. Dies zeigt, dass die Stimulation des TLR2- Signalweges zwar zu einer Induktion des pro-inflammatorischen Zytokines IL6 führt, DUSP5 jedoch entweder nicht in diesen Signalweg involviert ist oder der DUSP5-Verlust redundant durch andere Phosphatasen ausgeglichen werden kann. Auch bei der TNF α -Produktion ist bei der myeloiden Knockout- wie bei der WT-Maus bereits zwei Stunden nach TLR2-Stimulation (Pam₃Cys) ein Anstieg sichtbar. Wie bei IL6 ist aber kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und DUSP5-Knockout Mäusen zu beobachten (Abbildung 20).

5.2.2.2 Zelluläre Charakterisierung von aktivierten DUSP5-Knockout Zellen

Zusätzlich zur Untersuchung der Immunzellen gesunder Tiere sollte die Auswirkung des DUSP5-Verlustes bei aktiviertem Immunsystem untersucht werden. Dazu wurde bei DUSP5-Knockout und WT-Mäusen mit Thioglycolat eine Infektion ausgelöst und nach fünf Tagen die inflammatorischen Makrophagen aus der Bauchhöhle isoliert. Die so aktivierten Makrophagen wurden LPS und Pam₃Cys stimuliert. Die mittels ELISA gemessene IL6- und TNF α -Produktion zeigte keinen Unterschied zwischen den DUSP5-Knockout und WT-Mäusen. Dies zeigt, dass auch bei aktivierten Makrophagen der DUSP5-Verlust die Zytokinproduktion nicht beeinflusst.

5.3 Ausblick

Der Vergleich der Ergebnisse aus *in vitro* Experimenten mit DUSP5 überexprimierenden Makrophagen mit Ergebnissen aus Experimenten mit DUSP5-Knockout Mäusen zeigt, dass die in den *in vitro* Experimenten gemachten Beobachtungen *in vivo* nicht ohne weiteres durch deren gegenteiligen Effekt bestätigt werden können. Als Schlussfolgerung aus diesem Vergleich ergibt sich, dass eine Deletion von DUSP5 *in vivo* vermutlich deshalb keine schwerwiegenden oder anderweitig signifikanten Effekte auf die Zytokinproduktion hat, weil

von stark redundanten Regelsystemen mit weitreichenden kompensatorischen Effekten ausgegangen werden kann. Daraus ergibt sich für weiterführende Experimente, dass untersucht werden muss, welche weiteren Faktoren diese Kompensation ermöglichen. Ein Ansatz könnten dabei beispielsweise Experimente mit unterschiedlichen DUSP5-Knockout Immunzellen sein bei denen mithilfe von siRNA ein Knockdown weiterer DUSPs durchgeführt wird.

Die signifikant erhöhte Anzahl an Effektor-T-Zellen weist darauf hin, dass DUSP5 als De-Aktivator von ERK1/2 eine wichtige Funktion bei der Differenzierung der Gedächtnis-T-Zellen zu Effektor-T-Zellen einnehmen könnte und muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Neben der Untersuchung einzelner Immunzellen ist vor allem die Auswirkung des DUSP5-Verlustes nach einer Infektion von großem Interesse. Mithilfe des CASP-Modells kann untersucht werden, ob schwerwiegendere Effekte eventuell erst beim Verlauf einer schweren Infektion mit Beteiligung der angeborenen und adaptiven Immunantwort beobachtet werden können.

6 Zusammenfassung

Zur Bekämpfung von Pathogenen stehen dem Organismus, als Teil der angeborenen und adaptiven Immunantwort, unterschiedliche Abwehrmechanismen zur Verfügung. Eine wichtige Funktion haben dabei TLR-vermittelte Signalwege die, unter anderem durch Induktion von Zytokinen, Immunantworten regulieren. TLR-Signalwege finden unter Beteiligung von MAPK statt, deren Aktivierung durch Phosphorylierung spezifischer Aminosäurereste erfolgt. Daneben existiert eine große Gruppe von Phosphatasen, die diese MAPK wiederum deaktivieren. Eine dieser Phosphatasen, DUSP5 gehört zur Untergruppe der MAPK-spezifischen *dual specificity* Phosphatasen und wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit genauer untersucht. DUSP5 ist eine für die MAPK ERK1/2 spezifische Phosphatase. Des Weiteren zeigten Experimente mit Makrophagen, dass eine verstärkte DUSP5-Expression nach TLR-Stimulation in einer verstärkten Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL6 und TNF α resultiert, wobei die vermehrte Produktion abhängig von der lokalen Expression von DUSP5 im Zellkern ist. Interessanterweise konnte jedoch mithilfe von in Makrophagen exprimierten Funktionsmutanten gezeigt werden, dass die TLR-vermittelte Produktion des pro-inflammatorischen Zytokines TNF α unabhängig von der DUSP5 Phosphataseaktivität ist, der ERK1/2 Phosphorylierungszustand bleibt unverändert. Zur Untersuchung dieser Zusammenhänge *in vivo* wurde eine konditionale DUSP5-Knockout Maus, basierend auf dem Cre/lox-System generiert. Die DUSP5 Deletion konnte in Knockout Mäusen mittels PCR, Southernblot und auf RNA-Ebene mittels Realtime-PCR nachgewiesen werden. Die Knockout Tiere waren fertil und entwickelten sich normal. Die bei DUSP5 überexprimierenden Makrophagen gemachten Beobachtungen konnten jedoch nicht bestätigt werden. Der DUSP5 Verlust in Makrophagen führte zu keiner signifikant veränderten Zytokinproduktion. Eine mögliche Erklärung dafür sind stark redundante Regelsysteme mit weitreichenden kompensatorischen Effekten. Im Gegensatz dazu zeigte die Untersuchung weiterer Immunzellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort, dass DUSP5 Knockout Mäuse signifikant mehr Effektor/Gedächtnis-T-Zellen besitzen, und weisen auf eine Funktion von DUSP5 bei der T-Zelldifferenzierung und damit der adaptiven Immunantwort hin. Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass mindestens zehn verschiedene DUSPs die MAPK ERK1/2 deaktivieren, deuten außerdem darauf hin, dass Phosphatasen für die Feinabstimmung in der Regulation von Immunantworten verantwortlich sind.

7 Summary

Mammals developed a variety of defense mechanisms against pathogens. These mechanisms are part of innate and adaptive immune responses. TLR-mediated pathways play an important role in modulating these immune responses, e.g. through the induction of cytokines. MAPKs, which are activated by phosphorylation of specific amino acid residues are involved in this TLR signaling pathways. There is also a large group of MAPK phosphatases, which deactivate these MAPK. One of these phosphatases, DUSP5, belongs to the subgroup of MAPK-specific dual-specificity phosphatases and has been studied in this work in more detail. DUSP5 is specific for the MAPK ERK1/2. Further experiments with macrophages showed that increased DUSP5 expression resulted in increased production of the pro-inflammatory cytokines TNF α and IL6 after TLR stimulation. This increased expression is dependent on the expression of DUSP5 in the nucleus. Interestingly, it could be shown that the TLR-mediated production of the proinflammatory cytokine TNF α is independent of the DUSP5 phosphatase activity and that the ERK1/2 phosphorylation levels were unchanged. This could be shown by experiments using functional DUSP5 mutants expressed in macrophages. To closer investigate this relationship *in vivo*, a DUSP5 conditional knockout mouse, based on the Cre/lox system was generated. The DUSP5 deletion was confirmed by PCR, Southern blot and on RNA level by real time PCR. The knockout mice were fertile and developed normally. However, the observations made with DUSP5 overexpressing macrophages could not be extrapolated to findings with macrophages of DUSP5-knockout mice. Loss of DUSP5 showed no significant effects on macrophage cytokine production. This may due to strongly redundant control systems with extensive compensatory effects. In contrast, the investigation of other immune cells of the innate and adaptive immune system showed that DUSP5 knockout mice have a significantly increased number of effector/memory T cells, which indicates a role in DUSP5 in T-cell differentiation and therefore in adaptive immune responses. These results and the fact there are at least ten different DUSPs which can deactivate ERK1/2 suggest that phosphatases are responsible for the fine-tuning in the regulation of immune responses.

8 Literaturverzeichnis

1. Hörner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Bardenheuer HJ and Weigand MA (2004) [Role of the innate immune response in sepsis]. *Anaesthesist.*, 53, 10-28.
2. McGeer EG, Klegeris A and McGeer PL (2005) Inflammation, the complement system and the diseases of aging. *Neurobiol. Aging*, 26, 94-97.
3. Akira S, Uematsu S and Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
4. Medzhitov R and Janeway C Jr (2000) Innate immunity. *N Engl J Med.*, 343, 338-344.
5. Meylan E, Tschopp J and Karin M (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*, 442, 39-44.
6. Ogura Y, Sutterwala FS and Flavell RA (2006) The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Cell*, 126, 659-662.
7. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R and Nuñez G (2009) The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol.*, 10, 241-247.
8. Martinon F, Mayor A and Tschopp J (2009) The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol.*, 27, 229-265.
9. Pezzutto A, Ulrichs T and Burmester G R (2006) *Taschenbuch der Immunologie*. 2. Auflage.
10. Kawai T and Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.*, 11, 373-384.
11. Kumar H, Kawai T and Akira S (2009) Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*, 388, 621-625.
12. Dong C, Davis RJ and Flavell RA (2002) MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*, 20, 55-72.
13. Coulombe P and Meloche S (2007) Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta.*, 1773, 1376-1387.
14. Mahtani KR, Brook M, Dean JL, Sully G, Saklatvala J and Clark AR (2001) Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. *Mol Cell Biol.*, 21, 6461-6469.

15. Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C, Kontoyiannis D, Stamatakis K, Lin JH, Patriotis C, Jenkins NA, Copeland NG, Kollias G *et al.* (2000) TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell*, 103, 1071-1083.
16. Akira S, Takeda K and Kaisho T (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.*, 2, 675-680.
17. Medzhitov R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.*, 1, 135-145.
18. Cook DN, Pisetsky DS and Schwartz DA (2004) Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol.*, 5, 975-979.
19. Colotta F, Sims JE, Mantovani A and Dower SK (1994) The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today.*, 15, 562-566.
20. Brint EK, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie AN, O'Neill LA and Liew FY. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol.* 5(4), 373-379. 2004.
21. Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M, Tian L, Towne J, Sims JE, Stark GR and Li X. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol.* 4(9), 920-927. 2003.
22. Divanovic S, Trompette A, Atabani SF, Madan R, Golenbock DT, Visintin A, Finberg RW, Tarakhovsky A, Vogel SN, Belkaid Y *et al.* (2005) Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat Immunol.*, 6, 571-578.
23. Liew FY, Xu D, Brint EK and O'Neill LA (2005) Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*, 5, 446-458.
24. Wang Y, Tang Y, Teng L, Wu Y, Zhao X and Pei G (2006) Association of beta-arrestin and TRAF6 negatively regulates Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nature Immunology*, 7, 139-147.
25. Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone DL *et al.* (2004) De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*, 430, 694-699.
26. Negishi H, Ohba Y, Yanai H, Takaoka A, Honma K, Yui K, Matsuyama T, Taniguchi T and Honda K (2005) Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *PNA*, 102, 15989-15994.

27. Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA Jr, Medzhitov R and Flavell RA (2002) IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, 110, 191-202.
28. An H, Zhao W, Hou J, Zhang Y, Xie Y, Zheng Y, Xu H, Qian C, Zhou J, Yu Y *et al.* (2006) SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production. *Immunity*, 25, 919-928.
29. An H, Hou J, Zhou J, Zhao W, Xu H, Zheng Y, Yu Y, Liu S and Cao X (2008) Phosphatase SHP-1 promotes TLR- and RIG-I-activated production of type I interferon by inhibiting the kinase IRAK1. *Nature Immunology*, 9, 542-550.
30. Carmody RJ, Ruan Q, Palmer S, Hilliard B and Chen YH (2007) Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF-kappaB p50 ubiquitination blockade. *Science*, 317, 675-678.
31. Harzenetter MD, Novotny AR, Gais P, Molina CA, Altmayr F and Holzmann B (2007) Negative regulation of TLR responses by the neuropeptide CGRP is mediated by the transcriptional repressor ICER. *J Immunol.*, 179, 607-615.
32. Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM and Daly RJ (2009) Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J.*, 418, 475-489.
33. Camps M, Nichols A and Arkininstall S (2000) Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J.*, 14, 6-16.
34. Lyon MA, Ducruet AP, Wipf P and Lazo JS (2002) Dual-specificity phosphatases as targets for antineoplastic agents. *Nat Rev Drug Discov.*, 1, 961-976.
35. Keyse SM. (1998) Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity. *Semin Cell Dev Biol.*, 9, 143-152.
36. Tonks NK and Neel BG (2001) Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Cell Biol.*, 13, 182-195.
37. Haneda M, Sugimoto T and Kikkawa R (1999) Mitogen-activated protein kinase phosphatase: a negative regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Eur J Pharmacol.*, 365, 1-7.
38. Jeffrey KL, Camps M, Rommel C and Mackay CR (2007) Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov*, 6, 391-403.

39. Owens DM and Keyse SM (2007) Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*, 26, 3203-3213.
40. Theodosiou A, Smith A, Gillieron C, Arkinstall S and Ashworth A (1999) MKP5, a new member of the MAP kinase phosphatase family, which selectively dephosphorylates stress-activated kinases. *Oncogene*, 18, 6981-6988.
41. Mandl M, Slack DN and Keyse SM (2005) Specific inactivation and nuclear anchoring of extracellular signal-regulated kinase 2 by the inducible dual-specificity protein phosphatase DUSP5. *Mol Cell Biol.*, 25, 1830-1845.
42. Alessi DR, Smythe C and Keyse SM (1993) The human CL100 gene encodes a Tyr/Thr-protein phosphatase which potently and specifically inactivates MAP kinase and suppresses its activation by oncogenic ras in *Xenopus* oocyte extracts. *Oncogene.*, 8, 2015-2020.
43. Chu Y, Solski PA, Khosravi-Far R, Der CJ and Kelly K (1996) The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. *J Biol Chem.*, 271, 6497-6501.
44. Groom LA, Sneddon AA, Alessi DR, Dowd S and Keyse SM (1996) Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *EMBO J.*, 15, 3621-3632.
45. Muda M, Boschert U, Smith A, Antonsson B, Gillieron C, Chabert C, Camps M, Martinou I, Ashworth A and Arkinstall S (1997) Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4. *J Biol Chem.*, 272, 5141-5151.
46. Dowd S, Sneddon AA and Keyse SM (1998) Isolation of the human genes encoding the *pyst1* and *Pyst2* phosphatases: characterisation of *Pyst2* as a cytosolic dual-specificity MAP kinase phosphatase and its catalytic activation by both MAP and SAP kinases. *J Cell Sci.*, 111, 3389-3399.
47. Muda M, Theodosiou A, Rodrigues N, Boschert U, Camps M, Gillieron C, Davies K, Ashworth A and Arkinstall S (1996) The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.*, 271, 27205-27208.
48. Tanoue T, Yamamoto T, Maeda R and Nishida E (2001) A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. 276, 28, 26639.

49. Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J and Mustelin T (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, 117, 699-711.
50. Tonks NK (2011) Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 7, 833-846.
51. Rahmouni S, Cerignoli F, Alonso A, Tsutji T, Henkens R, Zhu C, Louis-dit-Sully C, Moutschen M, Jiang W and Mustelin T (2006) Loss of the VHR dual-specific phosphatase causes cell-cycle arrest and senescence. *Nat Cell Biol.*, 8, 524-531.
52. Todd JL, Tanner KG and Denu JM (1999) Extracellular regulated kinases (ERK) 1 and ERK2 are authentic substrates for the dual-specificity protein-tyrosine phosphatase VHR. A novel role in down-regulating the ERK pathway. *J Biol Chem.*, 274, 13271-13280.
53. Chen P, Li J, Barnes J, Kokkonen GC, Lee JC and Liu Y (2002) Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Biol Chem.*, 277, 6416.
54. Aoyama K, Nagata M, Oshima K, Matsuda T and Aoki N (2001) Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, LMW-DSP2, that lacks the cdc25 homology domain. *J Biol Chem.*, 276, 27575-27583.
55. Wu Q, Huang S, Sun Y, Gu S, Lu F, Dai J, Yin G, Sun L, Zheng D, Dou C *et al.* (2006) Dual specificity phosphatase 18, interacting with SAPK, dephosphorylates SAPK and inhibits SAPK/JNK signal pathway in vivo. *Front Biosci.*, 11, 2714-2724.
56. Guan KL, Broyles SS and Dixon JE (1991) Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. *Nature.*, 350, 359-362.
57. Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T and Nishida E. (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol.*, 2, 110-116.
58. Tanoue T, Yamamoto T and Nishida E (2002) Modular structure of a docking surface on MAPK phosphatases. *J Biol Chem.*, 277, 22942-22949.
59. Caunt CJ, Armstrong SP, Rivers CA, Norman MR and McArdle CA (2008) Spatiotemporal regulation of ERK2 by dual specificity phosphatases. *J Biol Chem.*, 283, 26612-26623.
60. Keyse SM and Emslie EA (1992) Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature*, 359, 644-647.

61. Kwak SP, Hakes DJ, Martell KJ and Dixon JE (1994) Isolation and characterization of a human dual specificity protein-tyrosine phosphatase gene. *J Biol Chem.*, 269, 3596-3604.
62. Liu Y, Shepherd EG and Nelin LD (2007) MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nat Rev Immunol*, 7, 202-212.
63. Kutay U and Güttinger S. Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends Cell Biol* 15, 121-124. 2005.
64. Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD and Smith AE (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39, 499-509.
65. Hammer M, Mages J, Dietrich H, Schmitz F, Striebel F, Murray PJ, Wagner H and Lang R (2005) Control of dual-specificity phosphatase-1 expression in activated macrophages by IL-10. *Eur J Immunol.*, 35, 2991-3001.
66. Alberola-Ila J, Forbush KA, Seger R, Krebs EG and Perlmutter RM (1995) Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature*, 373, 620-623.
67. Alberola-Ila J, Hogquist KA, Swan KA, Bevan MJ and Perlmutter RM (1996) Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J Exp Med.*, 184, 9-18.
68. Delgado P, Fernández E, Dave V, Kappes D and Alarcón B (2000) CD3delta couples T-cell receptor signalling to ERK activation and thymocyte positive selection. *Nature*, 406, 426-430.
69. Sugawara T, Moriguchi T, Nishida E and Takahama Y (1998) Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. *Immunity.*, 9, 565-574.
70. Werlen G, Hausmann B and Palmer E. (2000) A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature*, 406, 422-426.
71. Mariathasan S, Zakarian A, Bouchard D, Michie AM, Zúñiga-Pflücker JC and Ohashi PS (2001) Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. *J Immunol.*, 167, 4966-4973.
72. Tanzola MB and Kersh GJ (2006) The dual specificity phosphatase transcriptome of the murine thymus. *Molecular Immunology*, 43, 754-762.
73. Joyce DA, Steer JH and Ioda A. Dexamethasone antagonizes IL-4 and IL-10-induced release of IL-1RA by monocytes but augments IL-4-, IL-10-, and TGF-beta-induced suppression of TNF-alpha release. *J Interferon Cytokine Res.* 16, 511-517. 1996.

74. Sun H, Charles CH, Lau LF and Tonks NK (1993) MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell*, 75, 487-493.
75. Franklin CC and Kraft AS (1997) Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. *J Biol Chem.*, 272, 16917-16923.
76. Zhao Q, Wang X, Nelin LD, Yao Y, Matta R, Manson ME, Baliga RS, Meng X, Smith CV, Bauer JA *et al.* (2006) MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *JEM*, 203, 131-140.
77. Cohen J. (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.*, 420, 885-891.
78. Parillo JE (1993) Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med.*, 328, 1471-1477.
79. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A and Murphy KM (1993) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 260, 547-549.
80. Zhang Y, Blattman JN, Kennedy NJ, Duong J, Nguyen T, Wang Y, Davis RJ, Greenberg PD, Flavell RA and Dong C (2004) Regulation of innate and adaptive immune responses by MAP kinase phosphatase 5. *Nature*, 430, 793-797.
81. Cornell TT, Rodenhouse P, Cai Q, Sun L and Shanley TP (2010) Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 regulates the inflammatory response in sepsis. *Infect Immun.*, 78, 2868-2876.
82. Jeffrey KL, Brummer T, Rolph MS, Liu SM, Callejas NA, Grumont RJ, Gillieron C, Mackay F, Grey S, Camps M *et al.* (2006) Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1. *Nature Immunology*, 7, 274-283.
83. Shen YH, Godlewski J, Zhu J, Sathyanarayana P, Leaner V, Birrer MJ, Rana A and Tzivion G (2003) Cross-talk between JNK/SAPK and ERK/MAPK pathways: sustained activation of JNK blocks ERK activation by mitogenic factors. *J Biol Chem.*, 278, 26715-26721.
84. Kwak S.P. and Dixon J.E. (1995) Multiple dual specificity protein tyrosine phosphatases are expressed and regulated differentially in liver cell lines. *J Biol Chem.*, 270, 1156-1160.

85. Kucharska A, Rushworth LK, Staples C, Morrice NA and Keyse SM (2009) Regulation of the inducible nuclear dual-specificity phosphatase DUSP5 by ERK MAPK. *Cell Signalling*, 21, 1794-1805.
86. Kovanen PE, Rosenwald A, Fu J, Hurt EM, Lam LT, Giltneane JM, Wright G, Staudt LM and Leonard WJ (2003) Analysis of gamma c-family cytokine target genes. Identification of dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a regulator of mitogen-activated protein kinase activity in interleukin-2 signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 5205-5213.
87. Schories B, Janz M, Dörken B and Bommert K (2004) Downregulation of genes involved in DNA repair and differential expression of transcription regulators and phosphatases precede IgM-induced apoptosis in the Burkitt's lymphoma cell line BL60-2. *Biochim Biophys Acta*, 1676, 83-95.
88. Kühn R, Rajewsky K and Müller W (1991) Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science*, 254, 707-710.
89. Graham FL, Smiley J, Russell WC and Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen.Virol.* 36(1), 59-72. 1977.
90. Raschke WC, Baird S, Ralph P and Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 15(1), 261-267. 1978.
91. Mizushima S and Nagata S. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res* 18, 5322. 1990.
92. Birnboim HC and Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1523.
93. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 51, 263-273.
94. Cohen SN and Chang AC,H.L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2110-2114.
95. Southern,E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517.
96. Evans MJ and Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-156.

97. Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 78, 7634-7638.
98. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309, 255-256.
99. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA and Gough NM (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature.*, 336, 684-687.
100. Martini M. (2010) Charakterisierung der physiologischen Funktion des neuartigen Tumorsuppressors SASH1 und seiner Rolle in der Tumorgenese. Dissertation.
101. Geisse S, Gram H, Kleuser B and Kocher HP (1996) Eukaryotic expression systems: a comparison. *Protein Expr Purif.*, 8, 271-282.
102. Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 76, 4350-4354.
103. Kyhse-Andersen J (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods.*, 10, 203-209.
104. Salinovich O and Montelaro RC (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem.*, 156, 341-347.
105. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
106. Weber GF (2007) Charakterisierung der biologischen Effekte von IL-22 und IL-22-BP und deren immunologische Rolle während inflammatorischer Reaktionen. Dissertation.
107. Branda CS and Dymecki SM (2004) Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell*, 6, 7-28.
108. Rossant J and McMahon A (1999) "Cre"-ating mouse mutants-a meeting review on conditional mouse genetics. *Genes Dev.*, 13, 142-145.
109. Xaus J, Cardó M, Valledor AF, Soler C, Lloberas J and Celada A (1999) Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis. *Immunity.*, 11, 103-113.

110. Valledor AF, Comalada M, Xaus J and Celada A. (2000) The differential time-course of extracellular-regulated kinase activity correlates with the macrophage response toward proliferation or activation. *J Biol Chem.*, 275, 7403-7409.
111. Ebisuya M, Kondoh K and Nishida E (2005) The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci.*, 118, 2997-3002.
112. Murphy LO and Blenis J (2006) MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci.*, 31, 268-275.
113. Ishibashi T, Bottaro DP, Michieli P, Kelley CA and Aaronson SA (1994) A novel dual specificity phosphatase induced by serum stimulation and heat shock. *J Biol Chem*, 269, 29897-29902.
114. Hu S, Xie Z, Onishi A, Yu X, Jiang L, Lin J, Rho HS, Woodard C, Wang H, Jeong JS *et al.* (2009) Profiling the human protein-DNA interactome reveals ERK2 as a transcriptional repressor of interferon signaling. *Cell*, 139, 610-622.
115. Chen RH, Sarnecki C and Blenis J (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol.*, 12, 915-927.
116. Lenormand P, Sardet C, Pagès G, L'Allemain G, Brunet A and Pouyssegur J (1993) Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol.*, 122, 1079-1088.
117. Cook SJ, Aziz N and McMahon M (1999) The repertoire of fos and jun proteins expressed during the G1 phase of the cell cycle is determined by the duration of mitogen-activated protein kinase activation. *Mol Cell Biol.*, 19, 330-341.
118. Murphy LO, Smith S, Chen RH, Fingar DC and Blenis J (2002) Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol.*, 4, 556-564.
119. Murphy LO, MacKeigan JP and Blenis J (2004) A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. *Mol Cell Biol.*, 24, 144-153.
120. Jeong DG, Cho YH, Yoon TS, Kim JH, Ryu SE and Kim SJ (2007) Crystal structure of the catalytic domain of human DUSP5, a dual specificity MAP kinase protein phosphatase. *Proteins*, 66, 253-258.
121. Reinhart,K. (2011) Sprecher des Kompetenznetzes Sepsis. *Rheinische Post* 6. Mai 2011.

122. Kellum JA, Kong L, Fink MP, Weissfeld LA, Yealy DM, Pinsky MR, Fine J, Krichevsky A, Delude RL, Angus DC *et al.* (2007) Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. *Arch Intern Med.*, 167, 1655-1663.
123. Chi H, Barry SP, Roth RJ, Wu JJ, Jones EA, Bennett AM and Flavell RA (2006) Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *PNA*, 103, 2274-2279.
124. Hammer M, Mages J, Dietrich H, Servatius A, Howells N, Cato AC and Lang R (2006) Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock. *JEM*, 203, 15-20.
125. Salojin KV, Owusu IB, Millerchip KA, Potter M, Platt KA and Oravec T (2006) Essential role of MAPK phosphatase-1 in the negative control of innate immune responses. *J Immunol.*, 176, 1899-1907.
126. Kovanen PE, Bernard J, Al-Shami A, Liu C, Bollenbacher-Reilley J, Young L, Pise-Masison C, Spolski R and Leonard WJ (2008) T-cell development and function are modulated by dual specificity phosphatase DUSP5. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 17362-17369.
127. Pagès G, Guérin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auberger P and Pouyssegur J (1999) Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science*, 286, 1374-1377.
128. Sharp LL, Schwarz DA, Bott CM, Marshall CJ and Hedrick SM (1997) The influence of the MAPK pathway on T cell lineage commitment. *Immunity*, 7, 609-618.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

A20/(TNF AIP3)	Tumour necrosis factor α -induced protein 3
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	Adenosine-Uridine-rich elements
ATF2	Activating transcription factor 2
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl3	B-cell lymphoma 3-encoded protein
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CASP	Colon ascendens stent peritonitis
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Cell Division Cycle
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
Ci	Curie
Cre	Causes recombination
CREB	cAMP response element binding
DC	Dendritische Zelle(n)
d.h.	das heisst
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxy-ribonucleic acid
dNTP(s)	deoxy- nucleotide-triphosphates (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
ds-	doppelsträngig

DUSP	dual-specificity Phosphatasen
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
EyA	eyes absent
F2	Filial generation 2
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	Granulocyte-macrophage Colony Stimulating Factor
h	Stunde
HAD	Haloacid Dehalogenase
H ₂ O _{dd}	didestilliertes Wasser
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B Kinase
IKKi	Inducible I kappa-B kinase
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IRAK	IL-1R associated kinase
IRF	Interferon regulatory factors
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilo Dalton
KIM	Kinase-Interaktions-Motive
LB	Lysogeny Broth
LIF	Leukemia Inhibitory Factor

LMWPTP	low-molecular-mass PTP
loxP	locus X-ing over P1 phage
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (mol/l)
MΦ	Makrophagen
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
mA	Milliampere
MEM	modified eagle medium
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min.	Minute
MKP	Mitogen-activated protein kinase phosphatase
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
n	Anzahl
neo	Neomycin Phosphotransferase
NES	Nuclear Export Signal
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLK	NEMO-like Kinase
NLR	NOD-like receptors
NLS	Nuclear Localization Signal
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
Pam ₃ Cys	N-palmitoyl-(s)-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(RS)-propyl] cysteine
PBS	Phosphate buffered saline

PCR	Polymerase chain reaction
Pg	Pikogramm
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinases
PRL	Phosphatase of Regenerating Liver
PRR	Pattern recognition receptors
PTEN -like PTP	Phosphatase and Tensin Homologue-like PTP
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
p38	p38 mitogen-activated Protein Kinase
RIP1	Receptor interacting protein 1
RLH	RIG-like helicases
RIPA	Radion-Immunoprecipitation assay
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RP105	Radioprotective Protein 105 kDa
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institut Medium
RT	Raumtemperatur
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
SARM	Sterile-alpha and Armadillo motif-containing protein
SDS	Sodium-dodecylsulfat
SEM	Standard error of measurement
SHP	Src homology region 2 domain-containing phosphatase
SIGIRR	Single-Ig-Interleukin-1 related receptor
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
SOCS1	Suppressor of Cytokine Signaling 1
SRE	Serum Response Element
ss-	single strand

SSC	Sodiumchlorid-sodiumcitrate
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
ST2L / (IL1RL1)	Interleukin 1 receptor-like 1
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TAK1	Transforming Growth Factor β -activated Kinase 1
TBK1	TANK Binding Kinase 1
TBST	Tris buffered saline Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNE	Tris/NaCl/EDTA
TNF α	Tumor necrosis factor- α
TLR	Toll-like receptor
TOLLIP	Toll interacting protein
TIR	Toll/IL-1 receptor homology
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TRIAD3 / RNF216	Ring finger protein 216
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
U	Unit
UV	Ultra Violett
μ F	Mikrofarad
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
üN	über Nacht
V	Volt

v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
β -ME	β -Mercaptoethanol

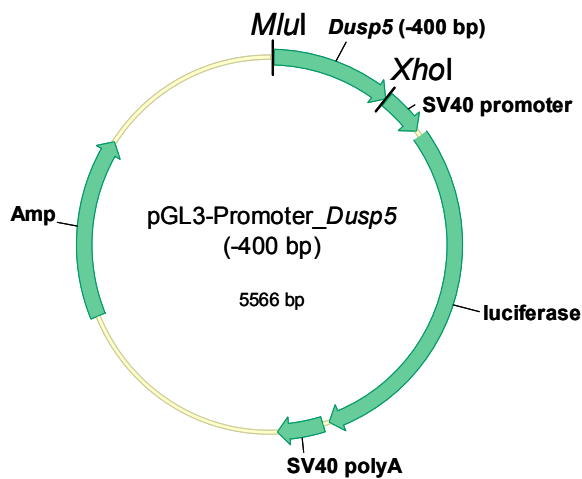
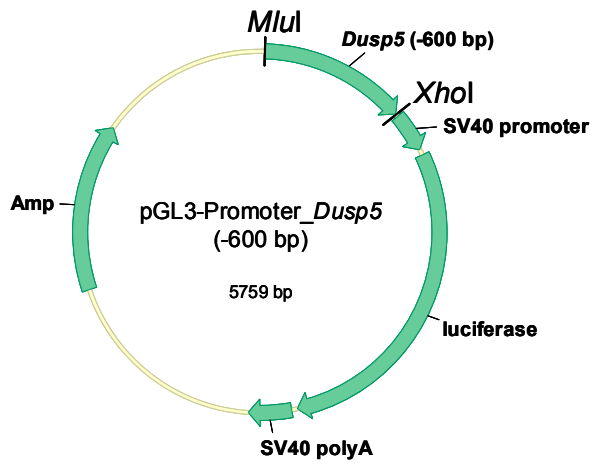
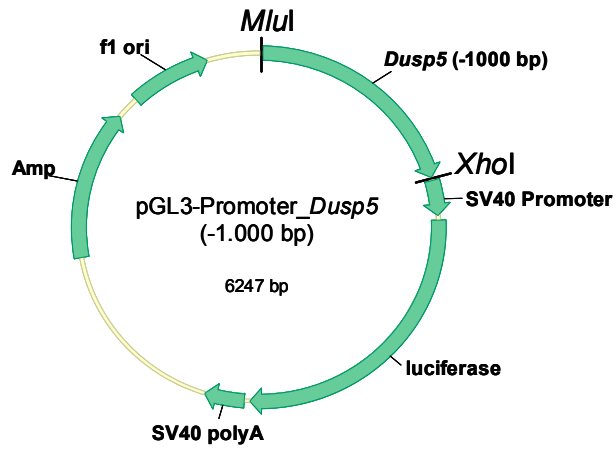
9.2 Abbildungsverzeichnis

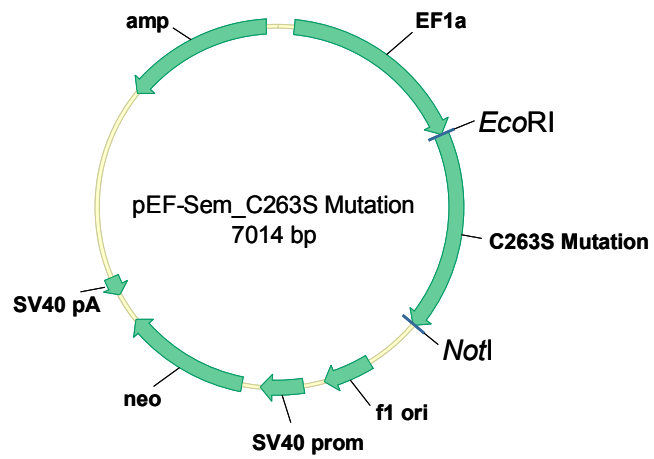
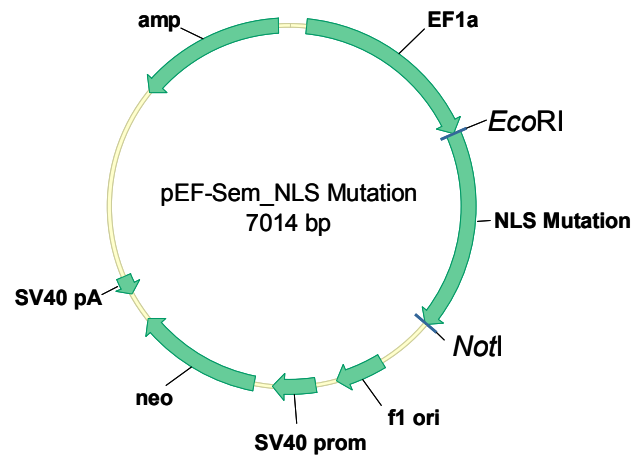
Abb. 1: Übersicht über die Signalwege der TLR und deren Inhibitoren.	3
Abb. 2: Die Einteilung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen.	7
Abb. 3: Gemeinsame strukturelle Merkmale der MAPK-spezifischen DUSPs.	10
Abb. 4: Die Rolle von DUSPs beim TLR-Signal auf dem Weg in den Zellkern.	13
Abb. 5: Schematischer Aufbau eines Kapillar-Blots.	49
Abb. 6: Im Sepsismodell zeigen WT-Mäuse in Leber, Milz und Lunge, nicht jedoch in den mesenterialen Lymphknoten eine erhöhte DUSP5-Transkription.	68
Abb. 7: Der DUSP5-Promoter kann durch Pam ₃ Cys und CGRP induziert werden.	69
Abb. 8: Die DUSP5-überexprimierenden Makrophagenzelllinie zeigt nach TLR-Stimulation eine erhöhte Zytokinproduktion.	71
Abb. 9: TLR2 stimulierte Zellen zeigen keine veränderte ERK-Phosphorylierung.	72
Abb. 10: Die katalytisch inaktive DUSP5-überexprimierenden Makrophagenzelllinie zeigt nach TLR2-Stimulation eine erhöhte Zytokinproduktion, die NLS mutierte DUSP5-überexprimierenden Makrophagenzelllinie zeigt nach TLR2-Stimulation keine erhöhte Zytokinproduktion.	74
Abb. 11: Strategie zur Generierung eines Inaktivierungsvektors.	76
Abb. 12: Untersuchung des Inaktivierungsvektors.	78
Abb. 13: Screening-PCR der ES-Zellklone.	79
Abb. 14: Analyse der transfizierten ES-Zellklone.	80
Abb. 15: Verpaarungsschema einer chimären Maus mit einer C57BL/6 Maus.	81
Abb. 16: Generierung des DUSP5-Knockout durch Cre-Rekombination.	82
Abb. 17: Nachweis der 5'-loxP-Sequenz.	83
Abb. 18: Nachweis der mutierten Allele.	83
Abb. 19: Nachweis des Dusp5-Knockout in knochenmarksgenerierten Makrophagen.	84
Abb. 20: DUSP5 ^{-/-} Makrophagen zeigen nach TLR2-Stimulation keine veränderte IL6- und TNF α -Produktion.	85
Abb. 21: DUSP5 ^{-/-} Makrophagen zeigen keine veränderte TNF α - und IL6-Produktion.	86
Abb. 22: DUSP5-Knockout Mäuse zeigen eine signifikant erhöhte Anzahl an Effektor-T- Zellen.	89
Abb. 23: Die Konzentration der Serum-Immunglobuline ist in DUSP5-Knockout-Mäusen unverändert.	90
Abb. 24: Hypothese zur Rolle von DUSP5 bei der Regulation der Zytokinproduktion.	97

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Ansätze für Klonierungskonstrukte, ES-Screening, Genotypisierungen.	41
Tabelle 2: PCR-Programme für Klonierungskonstrukte, ES-Screening, Genotypisierungen..	42
Tabelle 3: Zusammensetzung einer Restriktionsspaltung.	43
Tabelle 4: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.	45
Tabelle 5: Reaktionsansatz zur Dephosphorylierung eines Vektors.	46
Tabelle 6: DNA-Präparation der ES-Zellklone.	55
Tabelle 7: Pipettierschema der Calcium-Phosphat-Transfektion.	56
Tabelle 8: Pipettierschema der FuGENE [®] HD Transfektion.	57
Tabelle 9: Pipettierschema der jetPEI [™] Transfektion.	57
Tabelle 10: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele.	64
Tabelle 11: Aufzählung der im Versuch eingesetzten CDs und ihrer zellulären Reaktivität. .	87

9.4 Vektorkarten





Danksagung

Was bleibt am Ende dieser Arbeit zu sagen? Danke! Danke all jenen, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Prof. Bernhard Holzmann danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die sehr gute fachliche Führung durch die herausfordernde Welt der DUSPs.

Herrn Prof. Wolfgang Liebl danke ich für die Begleitung dieser Arbeit von Seiten Weihenstephans.

Herrn Dr. Michael Bösl danke ich für die Durchführung der Mikroinjektion und die vielen hilfreichen „Mausinfos“.

Herrn PD Dr. Klaus-Peter Janßen danke ich für das spontane Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich danke allen Laborkolleginnen und -Kollegen, den aktuellen sowie der großen Zahl Ehemaliger für die nette Atmosphäre und für die Hilfsbereitschaft im Laboralltag.

Besonders erwähnen möchte ich an dieser Stelle meine Laborkolleginnen Felicitas und Gabi, die neben ihrem Arbeitsplatz Laborfrust und -freude mit mir teilten und dank deren Methodenkenntnis vieles für mich einfacher war.

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Volker, Matthias, Markus und meinen Eltern: Meinem Freund Volker danke ich für seine große Unterstützung. Ich danke Dir für das kritische Lesen dieser Arbeit und die daraus resultierenden DUSP5-Diskussionen, die eine große Hilfe für mich waren. Mein Dank gilt auch meinen beiden Brüdern Matthias und Markus (dem besten Motivator bei kleinen Zwischentiefs) die immer für mich da waren. Meinen Eltern danke ich für die lebenslange Unterstützung, dafür dass Ihr bei Bedarf, Stuttgart-München zur Kurzstrecke erklärt habt und für mein zu Hause. Ich bin froh, dass Ihr alle da seid!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Julia Steudle

Geburtsdatum: 11.05.1981

Geburtsort: Nürtingen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsweg

2007 – 2012 Dissertation am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
Fakultät: Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt.

Thema: „Funktion der Dual-Specificity-Phosphatase-5 in Zellen des
angeborenen und adaptiven Immunsystems“

2000 – 2006 Studium der Biologie an der Eberhard Karls Universität Tübingen
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Eberhard Karls Universität
Tübingen (Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben)

Thema: „Genetische Analyse der Oxygenasen in den Glykopeptid-Produzenten
Amycolatopsis balhimycina und *Streptomyces toyocaensis*“

1991 – 2000 Hölderlin Gymnasium Nürtingen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1987 – 1991 Grundschule Schlaitdorf