

Klinikum rechts der Isar
Technische Universität München
Chirurgische Klinik und Poliklinik
Klinische Forschergruppe Sepsis

Zelltyp-spezifische Funktionen von TLR-Rezeptoren im angeborenen Immunsystem

Petra Gais

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. J.J. Hauner
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. M. Schemann
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 27.06.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan am 31.08.2007 angenommen.

Für Omi!

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Die angeborene Immunantwort.....	1
1.2. Signalwege in der angeborenen Immunantwort.....	5
1.3. Bedeutung der TLR Signalwege in der Sepsis	10
1.4. Zelltyp-spezifische Rolle der TLR-Signalwege	12
1.5. Zielsetzung der Arbeit	15
2. MATERIAL.....	16
2.1. Geräte und technisches Zubehör.....	16
2.2. Chemikalien.....	17
2.2.1. Radiochemikalien.....	19
2.3. Enzyme	19
2.4. Antikörper	20
2.4.1. Erstantikörper	20
2.4.2. Zweitantikörper	21
2.4.3. Isotypkontrollen	21
2.5. Reagenzienkits.....	21
2.6. Sonstige Verbrauchsmaterialien	22
2.7. Oligonukleotide	22
2.8. Klonierungsvektoren/Plasmide.....	24
2.9. Stammlösungen und Puffer.....	24
2.10. Medien für die Bakterienkultur	26
2.11. Medien für die Zellkultur	27
2.12. Bakterien.....	28
2.13. Zelllinien.....	28
2.14. Versuchstiere	29
3. METHODEN	30
3.1. Molekularbiologische Methoden.....	30
3.1.1. Enzymatische Behandlung von DNA	30
3.1.2. Ligation	30
3.1.3. Topo TA-Klonierung.....	31
3.1.4. Transformation von E.coli Bakterien	31
3.1.5. Präparation von Plasmid-DNA	31
3.1.6. Isolierung chromosomaler DNA aus ES-Zellen	32
3.1.7. Isolierung chromosomaler DNA aus Mausschwanz-Biopsien.....	32
3.1.8. Phenol-Chloroform-Extraktion	33
3.1.9. Ethanolfällung der DNA.....	33
3.1.10. Quantifizierung der DNA und RNA.....	33
3.1.11. Agarose-Gelelektrophorese.....	33
3.1.12. DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	34
3.1.13. DNA-Amplifikation durch PCR (polymerase chain reaction).....	34

Inhaltsverzeichnis

3.1.14.	Quantitative RT-PCR („real-time“-PCR)	35
3.1.15.	Präparation von RNA aus Primärzellen	36
3.1.16.	cDNA-Synthese	36
3.1.17.	Sequenzierung	37
3.1.18.	Southern Blot	37
3.2.	Zellbiologische Methoden	39
3.2.1.	Zellkultur	39
3.2.2.	Selektion rekombinanter ES-Zell-Klone	40
3.2.3.	Einfrieren von ES-Zellen	41
3.2.4.	<i>In vitro</i> Cre-Rekombination	41
3.3.	Biochemische Methoden	42
3.3.1.	Herstellung des LIF-Überstandes	42
3.3.2.	Herstellung von Zelllysaten	42
3.3.3.	Proteinbestimmung nach Pierce	42
3.3.4.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	43
3.3.5.	Western Blot	44
3.4.	Immunologische Methoden	45
3.4.1.	Stimulation von Zellen mit TLR-Agonisten	45
3.4.2.	Analyse von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie (FACS)	45
3.4.3.	ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)	46
3.5.	Tierversuche	47
3.5.1.	Organentnahme	47
3.5.2.	Superovulation	47
3.5.3.	Gewinnung embryonaler Fibroblasten	47
3.5.4.	Blastozysteninjektion	47
3.5.5.	Generierung chimärer Mäuse	48
3.5.6.	Isolierung muriner Primärzellen	48
3.5.7.	Generierung von myeloiden DC aus dem Knochenmark	48
3.5.8.	Isolierung von Milzzellen	49
3.5.9.	Thioglykollat-Injektion und Peritoneallavage	49
3.6.	Statistik	49
4.	ERGEBNISSE	50
4.1.	Teil 1: Generierung eines MyD88^{stp/stp} Mausstammes durch „switch on“-Mutagenese	50
4.1.1.	Klonierung des Targetvektors	50
4.1.2.	Erzeugung von MyD88 ^{stp/+} ES-Zellen durch homologe Rekombination	52
4.1.3.	Southern Blot Analyse der homolog rekombinierten ES-Zellen	54
4.1.4.	<i>In vitro</i> Cre-Rekombination	55
4.1.5.	Analyse der Cre-rekombinierten ES-Zellen im Southern Blot	57
4.1.6.	Generierung eines MyD88 ^{Stp/Stp} Mausstammes aus rekombinanten ES-Zellen	58

Inhaltsverzeichnis

4.1.7.	Nachweis der Funktionalität der integrierten Stopp-Kassette	61
4.2.	Teil 2: Zelltyp-spezifische Regulation der TLR4-stimulierten	64
	TNF-α Biosynthese	64
4.2.1.	TNF- α Proteinproduktion in Makrophagen versus DC	64
4.2.2.	mRNA-Produktion von TNF- α in Makrophagen versus DC	65
4.2.3.	Einfluss des Typ I IFN-abhängigen Signalweges auf die TNF- α	66
	Produktion	66
4.2.4.	Aktivierung des TypI-IFN unabhängigen Signalweges in	
	TRIF-mutierten DC	67
4.2.5.	Einfluss von TRIF auf die Sekretion von TNF- α in DC	69
4.2.6.	Einfluss von TRIF auf die Translation der TNF- α mRNA.....	70
5.	DISKUSSION	74
5.1.	Generierung eines MyD88^{stp/stp} Mausstammes	74
5.2.	Charakterisierung des generierten MyD88^{stp/stp} Mausstammes	76
5.3.	Ausblick 1	77
5.4.	Zelltyp-spezifische Regulation der TNF-α Biosynthese	78
5.5.	Ausblick 2	84
6.	ZUSAMMENFASSUNG	85
7.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	87
8.	TABELLENVERZEICHNIS	88
9.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	89
10.	DANKSAGUNG	100
11.	LEBENS LAUF	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Einleitung

1.1. Die angeborene Immunantwort

Die physiologische Aufgabe des Immunsystems ist es, den Organismus vor Infektionen durch allgegenwärtige Pathogene, insbesondere Bakterien und Viren, aber auch Pilze und Parasiten zu schützen. Kommt es über äußere oder innere Epitheloberflächen zum Kontakt mit Mikroorganismen aus der Umgebung, so bildet die angeborene Immunantwort die erste Verteidigungslinie des Wirtsorganismus. Unterschiedliche Erkennungssysteme und ein breites Spektrum an Effektormechanismen werden dabei benötigt, um Pathogene aufzuspüren und eine unmittelbare Immunreaktion auslösen zu können. Erst wenn Erreger es schaffen, die angeborenen Immun-Abwehrmechanismen des Wirtes zu umgehen bzw. zu überwinden, ist eine induzierte oder adaptive Immunantwort notwendig. Jedoch wird angenommen, dass 99% aller Infektionen durch das angeborene Immunsystem beherrscht werden [1].

Die angeborene Immunantwort setzt sich aus zwei Abwehrmechanismen zusammen, die in einer schematischen Darstellung in Abb. 1 zusammengefasst sind. Zum einen wird der Erreger unmittelbar durch Opsonisierung, Phagozytose und direkte Erregerlyse unspezifisch beseitigt. In diese Prozesse sind das sogenannte Komplement, ein System von Plasmaproteinen, das an den Oberflächen der Mikroorganismen eine Kaskade von proteolytischen Reaktionen auslöst und einige Akute-Phase-Proteine (MBL, LBP) involviert [2]. Das zweite Abwehrsystem setzt sich aus Mustererkennungsrezeptoren sowie C-typ Lektin-ähnlichen Membranrezeptoren zusammen, die evolutionär hochkonservierte Strukturen der Pathogene erkennen und dann über Aktivierung intrazellulärer Signalwege die Genexpression der Immunzellen beeinflussen [2-4].

Das Komplement spielt eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von Mikroorganismen im Blutkreislauf und im extrazellulären Raum. Es kann auf drei verschiedene Arten aktiviert werden. Der klassische Weg der Komplementaktivierung wird durch die Bindung von C1q, dem ersten Protein der Komplementkaskade an die Oberfläche des Pathogens ausgelöst. Das Mannose-bindende Lektin (MBL), ein Serumprotein setzt hingegen den MBL-Weg in Gang. Es bindet mannosehaltige Kohlenhydratreste an der Oberfläche von Bakterien oder Viren und aktiviert so MBL-assoziierte Serinproteasen (MASP-1, MASP-2), wodurch der Komplement-Signalweg aktiviert wird. Der dritte Reaktionsweg wird als alternativer Weg bezeichnet und dient der Verstärkung des klassischen Weges. Er wird durch Bindung spontan aktivierter Komplementproteine an die Oberfläche von Pathogenen aktiviert. Die Reaktionswege laufen schließlich zusammen. Innerhalb der nachfolgenden Signalkaskade entsteht durch Spaltung von C3 C3b, das wichtigste Effektormolekül des Komplements. Die Bindung zahlreicher C3b Moleküle an das

Einleitung

Pathogen stellt ein zentrales Ereignis der Komplementaktivierung dar. Sie wirken als Opsonine und markieren das Pathogen für die Zerstörung durch Phagozyten, welche Rezeptoren für C3b besitzen [5, 6]. Bei der Phagozytose erzeugen Makrophagen und Neutrophile toxische Produkte, die bei der Eliminierung des Erregers mitwirken. Die wichtigsten Produkte sind Wasserstoffperoxyd (H_2O_2), das Superoxidanion (O_2^-) und das Stickoxid (NO). Lysosomale NADPH-Oxidasen und andere Enzyme erzeugen diese Verbindungen in einem Prozess, den man auch als respiratorische Entladung (respiratory burst) bezeichnet, da der Sauerstoffverbrauch dabei vorübergehend stark zunimmt. Die kleinen Spaltprodukte von C3, C4 und besonders von C5, die bei Ablauf der Komplement-Kaskade entstehen, wirken zudem chemotaktisch, wodurch weitere Phagozyten zum Infektionsherd rekrutiert und gleichzeitig aktiviert werden. Bei voller Aktivierung des Komplements kommt es zur Zusammenlagerung der terminalen Komponenten (C5b, C6, C7, C8, C9) zum lytischen Makromolekül, das als MAC (membrane attack complex) bezeichnet wird. MAC erzeugt eine Pore in der Lipiddoppelschicht der Membran, wodurch diese beschädigt und der Erreger folglich zerstört wird. Ein System von regulatorischen Proteinen verhindert die Gewebeschädigung infolge zufälliger Bindung von aktivierten Komplementproteinen an Wirtszellen sowie die spontane Aktivierung von Komplementkomponenten im Plasma. Sind Wirtszellen jedoch nicht ausreichend geschützt, werden auch diese durch Lyse zerstört. Der Vorgang wird auch als „bystander“ Lyse bezeichnet [2].

Neben der Phagozytose kann die Bindung von Pathogenen auch induzierte Antworten der angeborenen Immunität hervorrufen, die zu einer veränderten Genexpression von Immunzellen führen. Eine Familie von Transmembranrezeptoren kann derartige Reaktionswege auslösen. Es handelt sich dabei um Mustererkennungsrezeptoren, die aufgrund ihrer Homologie zu Toll, einem Molekül, das die Produktion antimikrobieller Proteine in *Drosophila melanogaster* stimuliert, Toll-like Rezeptoren (TLRs) genannt werden [7-9]. TLRs besitzen neben ihrer Transmembran-Domäne extrazellulär Leucin-reiche Regionen (LRR, leucin rich repeat) und intrazellulär eine TIR (Toll/IL-1 receptor homology) Domäne [10, 11]. Die LRR-Motive sind für die spezifische Erkennung der pathogenen Strukturen, den sogenannten PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) verantwortlich. Die zytoplasmatische TIR-Domäne ist für die Erzeugung intrazellulärer Signale essentiell. Gegenwärtig sind 12 Mitglieder der TLR-Familie in Säugern (*Mus musculus*) bekannt [3], deren Expression sich nicht auf Immunzellen beschränkt. Neben Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Neutrophilen, Mastzellen, B-Zellen und regulatorischen T-Zellen exprimieren auch Fibroblasten, Endothelzellen und intestinale Epithelzellen TLRs [12]. Die Aktivierung der TLR-Signalwege führt zur Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, die lokal zur Infiltration weiterer phagozytierender Zellen führen und somit eine Entzündungsreaktion auslösen.

Einleitung

Eine weitere Klasse membranständiger Mustererkennungsrezeptoren sind vermutlich C-typ Lektin-ähnliche Rezeptoren, zu denen auch Dektin-1 gehört. Bei Dektin-1 handelt es sich um ein Typ II Transmembranprotein mit einer extrazellulären C-typ Lektin Domäne und einem intrazellulären ITA (immunoreceptor tyrosine-based activation)-Motiv [3].

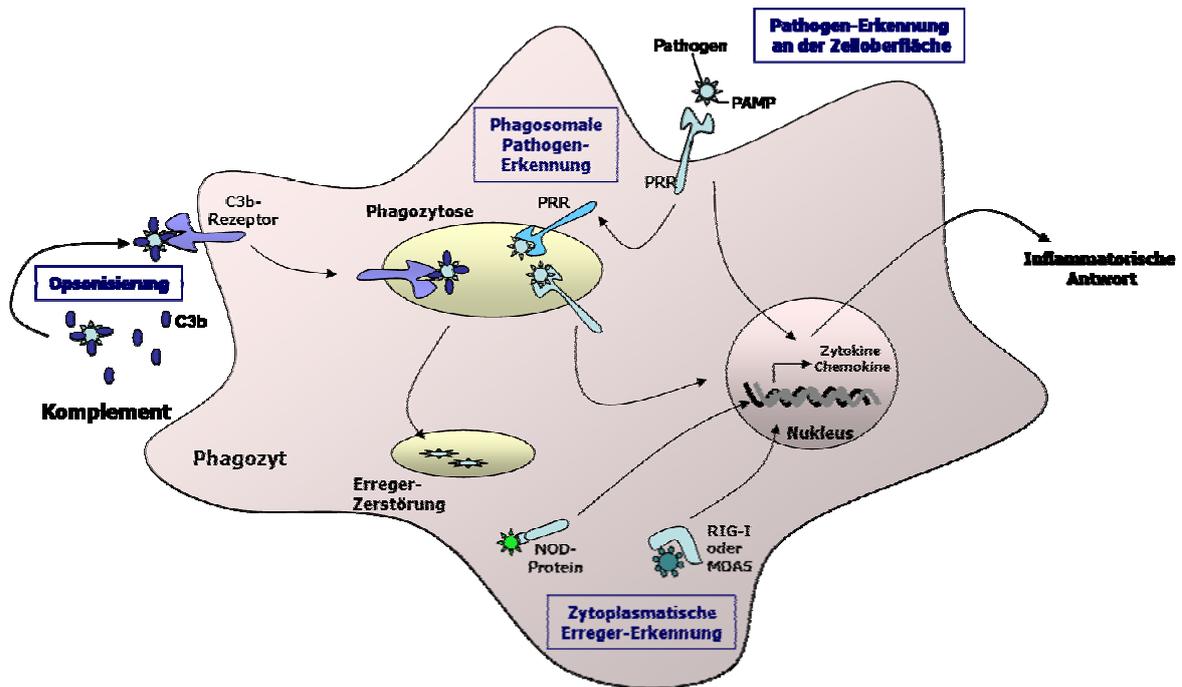


Abb. 1: Pathogen-Erkennungssysteme der angeborenen Immunantwort.

Die angeborene Immunantwort benötigt unterschiedliche Erkennungssysteme, um Pathogene aufzuspüren. Extrazellulär werden Erreger durch das Komplementsystem opsonisiert und anschließend von der Zelle durch Phagozytose aufgenommen und zerstört. An der Zelloberfläche erfolgt die Pathogen-Erkennung durch Mustererkennungsrezeptoren (PRR; pattern recognition receptors), wie durch Toll-like Rezeptoren (TLRs) und Dektin-1. Durch spezifische Erkennung von pathogenen Strukturen entstehen definierte intrazelluläre Signale, die zur Produktion von Zytokinen und Chemokinen führen, wodurch die inflammatorische Antwort eingeleitet wird. Einige TLRs sind in der Membran intrazellulärer Vakuolen (Endosomen) lokalisiert und erkennen dort Komponenten der durch Phagozytose aufgenommenen Pathogene. Erreger, die in das Zytosol der Zelle eindringen, werden von zytoplasmatischen Mustererkennungsrezeptoren detektiert, den sogenannten NOD-Proteinen, die intrazelluläre Bakterien erkennen, sowie von RIG-I bzw. MDA5, die jeweils über ihre Helikase-Domänen doppelsträngige virale RNA erkennen.

NOD (nucleotide binding oligomerization), RIG-I (retinoic-acid-inducible gene-I), MDA5 (melanoma-differentiation-associated gene 5)

Pathogene, die in Zellen eindringen, wie etwa intrazelluläre Bakterien und Viren, werden von zytoplasmatischen Mustererkennungsrezeptoren detektiert. Diese können jeweils einer von zwei Molekülklassen zugeordnet werden. Die erste bilden die NOD-LRR Proteine, die aus einer LRR-Domäne für die Liganderkennung, einer NO (nucleotide

Einleitung

binding oligomerization)-Domäne und einer CAR (Caspase recruitment)-Domäne, die die Signalübertragung initiieren, zusammengesetzt sind [13]. Die zweite Klasse bilden Proteine, die Helikase-Domänen zur Erkennung von viraler RNA besitzen, wie beispielsweise RIG-I (retinoic acid inducible gene-I) [14]. Dadurch kommt es nach Erkennung eines Virus zur Induktion proinflammatorischer Zytokine sowie zur Produktion von Interferonen. Über letztere werden beispielsweise NK-Zellen (natural killer) aktiviert, welche virusinfizierte Zellen erkennen und abtöten können.

Die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen als Folge der Erkennung durch das angeborene Immunsystem bewirkt nachfolgend eine massive Infiltration und Aktivierung von Abwehrzellen. So werden z.B. Neutrophile an den Entzündungsort rekrutiert, um dort Pathogene durch Phagozytose zu eliminieren. Die Zytokine IL-1 (interleukin-1) und TNF- α (tumor necrosis factor- α) ermöglichen diese Rekrutierung, indem sie die Expression von Zelladhäsionsmolekülen (Selectine, ICAM, VCAM) auf den Endothelzellen hochregulieren. Aber auch die freigesetzten Chemokine IL-8, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein), MIP-1 α und -1 β (macrophage inflammatory protein-1 α , -1 β) tragen zur Rekrutierung von Immunzellen bei, indem sie an das Endothel binden und die Aktivierung der Leukozyten durch Konformationsänderung der Integrine hervorrufen [15]. Die Adhäsion der Zellen an das Endothel wird erhöht und es kommt dem Chemokingradienten folgend zur Einwanderung der Zellen an den Infektionsherd [16-18]. Zudem wird das Endothel durchlässiger und die Flussrate (und damit der Austausch) der Lymphflüssigkeit wird erhöht, wodurch aktivierte dendritische Zellen aus dem Gewebe in regionale Lymphknoten einwandern können. Dort fungieren sie als antigenpräsentierende Zellen und können gegebenenfalls eine adaptive Immunantwort einleiten. Mit der Induktion der Zelloberflächenmolekül-Expression ist die Wirkung von TNF- α und IL-1 jedoch noch nicht erschöpft. Beide Immunmediatoren binden auch an Rezeptoren neutrophiler Zellen und Makrophagen und führen so zu deren Aktivierung. Dadurch nimmt die Phagozytoseaktivität der Neutrophilen zu und Makrophagen werden autokrin und parakrin zur weiteren Zytokinproduktion angeregt. Bei stärkeren Infektionen bleibt diese nicht lokal begrenzt, sondern es treten systemische Effekte auf. IL-6 und CSFs (colony-stimulating factors) der Makrophagen induzieren im Knochenmark die Neubildung und Mobilisierung großer Mengen an Neutrophilen. In der Leber induzieren TNF- α , IL-1 und IL-6 die Bildung von Akute-Phase-Proteinen wie beispielsweise das C-reaktive Protein. Weiterhin induziert das von Makrophagen sezernierte TNF- α und IL-1 die Bildung von Prostaglandinen, welche durch ihre Wirkung am Hypothalamus eine Fieberreaktion auslösen. Breitet sich die Entzündung unkontrollierbar über den Körper aus (systemische Infektion), kann es zum septischen Schock kommen [19].

Einleitung

1.2. Signalwege in der angeborenen Immunantwort

Die verschiedenen Mustererkennungsrezeptoren reagieren mit spezifischen PAMPs. Dadurch werden differentielle Signalwege aktiviert, die jeweils eine charakteristische Antwort auf das Pathogen hervorrufen. Aufgrund ihrer Primärsequenz kann die Familie der TLRs in verschiedene Unterfamilien eingeteilt werden, die ähnliche PAMPs erkennen. Lipopeptide werden beispielsweise durch TLR1, -2 und -6 erkannt. Dagegen binden die verwandten TLR7, -8 und -9 Nukleinsäuren. Zu den TLR-Rezeptoren, die strukturell verschiedene PAMPs erkennen, zählt TLR4. Neben Lipopolysacchariden aus der Zellwand gram-negativer Bakterien kann er ebenso durch bestimmte Viren (RSV, MMTV) und Pilzproteine (Mannan) sowie durch wirtseigene Proteine wie Fibronectin und Hitzeschock-Proteine aktiviert werden. In Abb. 2 sind wichtige Liganden der TLR-Rezeptoren in einer Übersicht dargestellt.

Viren		Bakterien		Parasiten	
TRL-Rezeptor	Ligand	TRL-Rezeptor	Ligand	TRL-Rezeptor	Ligand
TLR2	Hämagglutinin-Protein	TLR1/TLR2	Triacyl-Lipopeptide	TLR2	tGPI-Mutin
TLR3	dsRNA	TLR2	Peptidoglycan (PG)	TLR4	Glucositol-Phospholipide
TLR4	VSV-G, MMTV-G	TLR2	Porine	TLR9	Hämozoin
TLR7	ssRNA	TLR2	Lipoarabino-Mannan (LAM)	TLR11	Profilin-ähnliche Moleküle
TLR8	ssRNA				
Pilze		TLR2/TLR6	Diacyl-Lipopeptide	Wirt	
TRL-Rezeptor	Ligand	TLR2/TLR6	Lipoteichonsäure (LTA)	TRL-Rezeptor	Ligand
TLR2	Phospholipomannan	TLR4	Lipopolysaccharid (LPS)	TLR4	Hitzeschock-Proteine 60, 70
TLR2/TLR4	Glucuronoxylomannan (GXM)	TLR5	Flagellin	TLR4	Fibrinogen
TLR2/TLR6	Zymosan	TLR9	CpG-DNA		
TLR4	Mannan				

Abb. 2: Übersicht über TLR-Rezeptoren und ihre Liganden. Einteilung der TLR-Rezeptoren mit den jeweiligen Liganden nach folgenden Klassen: Viren, Bakterien, Parasiten, Pilze und Wirt. TLR (Toll-like receptor), dsRNA (doppelsträngige RNA), VSV-G (vesicular stomatitis virus-glycoprotein), MMTV-G (mouse mammary tumor virus surface-glycoprotein), LPS (Lipopolysaccharide)

Einleitung

Während die TLR-Rezeptoren 1, -2, -4, -5 und -6 an der Zelloberfläche lokalisiert sind, befinden sich TLR3, -7, -8 und -9 an den Membranen intrazellulärer Kompartimente, den Lysosomen und Endosomen [20]. Nach Ligand-Bindung dimerisieren TLRs und ändern ihre Konformation, wodurch an die Membran rekrutierte Adapterproteine mit ihrer TIR-Domäne an jene der TLRs binden können. Fünf dieser Adapterproteine sind derzeit bekannt: TIRAP (TIR domain-containing adaptor protein), MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TRAM (TRIF-related adaptor molecule), TRIF (TIR domain-containing adapter protein inducing IFN- β) und SARM/TIR-1 (sterile α and armadillo motifs) [3, 21]. Die unterschiedlichen Antworten verschiedener TLR-Rezeptoren werden durch eine selektive Nutzung dieser Proteine wesentlich beeinflusst (siehe Abb. 3). Das Adaptorprotein MyD88 ist essentiell für alle TLR-Signalwege ausgenommen TLR3. Nach TLR-Ligation rekrutiert MyD88 über seine Death-Domäne IRAK Kinasen (IL-1R associated kinases) sowie TRAF6 (TNF receptor associated factor). TRAF6 aktiviert über TAK1 (transforming growth factor β -activated kinase 1) I κ B-Kinasen, die I κ B α phosphorylieren. Das I κ B α Protein wird dadurch aktiviert und polyubiquitiniert, wodurch eine Degradation des Proteins erfolgt. Infolgedessen wird NF- κ B aus dem I κ B-NF- κ B-Komplex freigesetzt und kann in den Kern translozieren, um dort die Transkription proinflammatorischer Zytokine zu induzieren [22, 23].

Neben NF- κ B wird der MAP Kinasen-Signalweg über TAK1 aktiviert. Dies führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der AP-1 (activating protein-1) und Ets (E twenty-six) Familie [24, 25]. Die TLR-Rezeptoren TLR7, -8 und -9 können zusätzlich zur NF- κ B-Aktivierung IRFs (interferon-regulatory factors) induzieren. Die Aktivierung von IRFs durch den TLR7 und -9 Signalweg ist spezifisch für plasmazytoide dendritische Zellen näher beschrieben, wobei ein Komplex aus MyD88, IRAK Kinasen, TRAF6 und IRF-7 gebildet wird, der die Produktion von IFN- α aktiviert [26, 27].

Im Falle von TLR2 und TLR4 wird für die MyD88-Rekrutierung zusätzlich das Adaptorprotein TIRAP benötigt. TLR3 vermittelt hingegen intrazelluläre Signale via TRIF, das über TBK1 (TANK binding kinase1) eine Aktivierung von IRF-3 hervorruft, wodurch der Transkriptionsfaktor dimerisiert und anschließend in den Kern transloziert [28-30]. Dort bewirkt IRF-3 die Expression des Typ I Interferons IFN β , welches über den IFN-Rezeptor die Expression von Chemokinen (IP-10, RANTES) [29, 31] induziert. Während TLR3 direkt mit TRIF interagieren kann, benötigt der TLR4-Rezeptor ein weiteres Adapterprotein namens TRAM, um mit TRIF interagieren zu können. TRIF kann neben der Aktivierung von IRF-3 auch den NF- κ B-Signalweg induzieren. Der Signalweg verläuft dabei entweder über TRAF6 oder RIP1 (receptor interacting protein1) [32, 33].

Der TLR4-Rezeptor induziert derzeit den einzigen bekannten TLR-Signalweg, der mehr als 2 Adapterproteine für eine vollständige Signaltransduktion benötigt. Da der TLR4 Ligand LPS, ein Polysaccharid gram-negativer Bakterien, einer der potentesten TLR-Aktivatoren ist, scheint hier eine komplexe Regulation nötig zu sein. Nach der Freisetzung von LPS in den Blutstrom assoziiert dieses zunächst mit dem Akute-Phase-Protein LBP (LPS binding

Einleitung

protein). Anschließend erfolgt Bindung an CD14, ein GPI (Glucosylphosphatidylinositol)-verankertes Protein der Zellmembran von Phagozyten. LPS wird dann zu MD-2 transferiert, das mit TLR4 assoziiert. Nach Oligomerisierung des Rezeptors erfolgt schließlich die intrazelluläre Signaltransduktion [34, 35]. Über den MyD88-abhängigen Weg werden nach NF- κ B-Aktivierung proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-6) und Chemokine (KC) gebildet. Der MyD88-unabhängige Weg über TRIF führt via IRF-3 zur Expression einer Reihe von IFN-induzierter Gene, die hauptsächlich für Chemokine codieren. Zudem wird über TRIF zeitlich verzögert ebenfalls der NF- κ B-Weg aktiviert, der gleichermaßen die Expression proinflammatorischer Gene unterstützt.

Die Funktion des oben angeführten fünften Adapterproteines, SARM/TIR-1 wurde erst kürzlich für das humane System aufgeklärt. Carty et al. zeigten, dass das humane SARM mit TRIF interagiert und dabei einen Negativregulator im TLR-Signalweg darstellt [36].

Dektin-1 ist nach derzeitigem Wissensstand der einzige nicht-TLR-Rezeptor, der in die Pathogen-Erkennung an der Zelloberfläche involviert ist. Es handelt sich bei diesem Protein um einen Typ II Transmembran-Rezeptor, der über seine extrazelluläre CR-Domäne (carboanhydrate-recognition domain) β -Glucane, wie Zymosan erkennt. Dektin-1 ist somit der essentielle Rezeptor für die β -Glucan-Erkennung auf Makrophagen und Dendritischen Zellen [37-39]. Eine hohe Expression in den genannten Zellen findet man vor allem in der Lunge sowie im Darm [40, 41]. Der Signalweg von Dektin-1 verläuft über eine intrazelluläre Domäne (ITAM), welche durch Kinasen der Src Familie phosphoryliert wird. Infolgedessen wird SYK (SH2-domain-containing protein spleen tyrosine kinase) an die intrazelluläre Membranseite rekrutiert und es erfolgt die Aktivierung von NF- κ B. Benötigt wird hierfür das Adapterprotein CARD9 (CARMA1-related adapter protein 9), welches MALT1 (mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1) und Bcl-10 (B-cell leukemia/lymphoma 10) bindet und auf diesem Weg den IKK-Komplex aktiviert [38, 42, 43]. Des Weiteren wird auch eine kooperative Signaltransduktion mit TLR-Rezeptoren postuliert [37, 39].

Einleitung

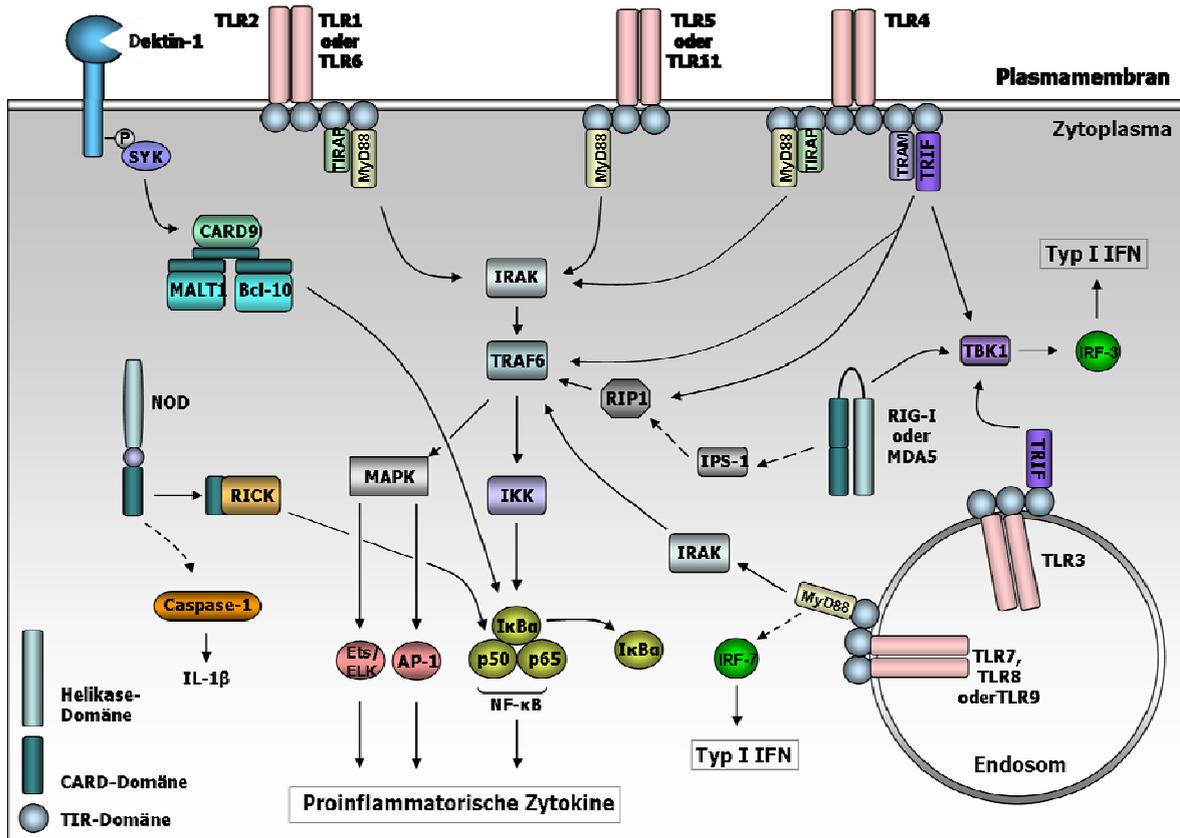


Abb. 3: Schematische Übersicht über Signalwege der angeborenen Immunantwort. Die Signalwege der Mustererkennungsrezeptoren sind vereinfacht mit ihren Hauptkomponenten dargestellt. Das zentrale Adapterprotein der TLR-Rezeptoren MyD88 vermittelt die Signaltransduktion über IRAK und TRAF6 zu NF-κB und AP-1. Im Falle von TLR2 und TLR4 wird zusätzlich TIRAP als Adapter benötigt. In pDCs (plasmazytoiden dendritischen Zellen) wird die TypI IFN-Produktion ausgehend von TLR7 und TLR9 MyD88-abhängig über IRF-7 induziert. Die TypI IFN-Produktion über TLR4 und TLR3 ist TRIF-vermittelt, wobei der Signalweg über TBK1 verläuft. TLR4 benötigt für diesen Signalweg zusätzlich das Adapterprotein TRAM. Zudem wird über TRIF auch NF-κB aktiviert, wobei die Aktivierung entweder über RIP1 oder direkt über TRAF6 verläuft. Die zytoplasmatischen Proteine RIG-I und MDA5 können sowohl eine NF-κB-Aktivierung über RIP1 und TRAF6 als auch eine TypI IFN Produktion über TBK1 hervorrufen. NOD-Proteine aktivieren NF-κB über die Kinase RICK. Gleichzeitig führt die Aktivierung der Caspase-1 zur Prozessierung von pro-IL-1β zum wirksamen IL-1β. Dektin-1 ist der essentielle Rezeptor für die β-Glucanerkennung, welche über einen noch wenig aufgeklärten Signalweg eine NF-κB Aktivierung hervorruft. SYK (SH2-domain-containing protein spleen tyrosine kinase), CARD9 (CARMA1-related adapter protein 9), MALT1 (mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1), Bcl10 (B-cell leukemia/lymphoma 10) TLR (toll-like receptor), TIRAP (TIR domain-containing adaptor protein), MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TRIF (TIR domain containing adapter protein inducing interferon β), TRAM (TRIF-related adapter molecule), IRAK (IL-1 receptor associated kinase), TRAF6 (TNF receptor associated factor), IKK (IκB kinases), MAPK (MAP kinases), RIP1 (receptor interacting protein1), NF-κB (nuclear factor κB), AP-1 (activating protein-1), Ets (E twenty-six), ELK (Ets like kinase), NOD (nucleotide-binding oligomerization domain), RICK (Rip-like interacting caspase-like apoptosis-regulatory protein kinase), IFN (interferon), IRF (IFN regulatory factor), RIG-I (retinoid acid inducible gene-I), MDA5 (melanoma-differentiation-associated gene 5), IPS (interferon-beta promoter stimulator 1)

Einleitung

Wie bereits erläutert, erkennen TLRs Pathogene an der Zelloberfläche oder in lysosomalen bzw. endosomalen Membranen. Dies weist darauf hin, dass das TLR-System nicht für die Detektion ins Zytosol eingewanderter Pathogene verantwortlich ist. Diese Aufgabe wird von zytoplasmatischen Mustererkennungsrezeptoren übernommen. Sie werden klassifiziert in NOD-LRR-Proteine, die bakterielle Komponenten erkennen und CARD-Helikase-Proteine, die für eine virale Erkennung zuständig sind. Für zwei Proteine der NOD-Familie, NOD1 und NOD2, sind Liganden und Signalwege bekannt. Die beiden Proteine detektieren Moleküle des bakteriellen Peptidoglycans (iE-DAP; γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid und MDP; muramyl dipeptide). Die Ligandbindung führt zur Oligomerisierung und nachfolgenden NF- κ B-Aktivierung. Dies erfolgt über homophile Interaktion der CAR (Caspase-recruitment)-Domäne einer Serin-Threonin-Kinase namens RICK (Rip-like interacting caspase-like apoptosis-regulatory protein kinase) mit der N-terminalen CARD-Domäne des NOD-Proteins. Zusätzlich wird die Caspase-1 aktiviert, die die Prozessierung von pro-IL-1 β zum wirksamen Zytokin katalysiert [44].

In infizierten Zellen wird virale RNA für die Replikation des Virus synthetisiert. Die zytoplasmatischen Proteine RIG-I (retinoic-acid-inducible gene I) und MDA5 (melanoma-differentiation-associated gene 5) detektieren virale RNA über ihre Effektor-CARD und Helikase-Domänen, wobei beide Proteine jeweils unterschiedliche Viren erkennen. Hornung et al. konnten zeigen, dass das von viralen Polymerasen generierte 5'-Triphosphat Ende für die Erkennung durch RIG-I jedoch nicht durch MDA-5 verantwortlich ist. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich um einzelsträngige oder doppelsträngige RNA handelt [45]. Wirtseigene RNA besitzt ebenfalls ein 5'-Triphosphat Ende. Dieses wird jedoch durch eine „Kappe“ verdeckt und kann somit nicht detektiert werden. Der Ligand für MDA-5 ist bislang noch nicht identifiziert worden.

Nach erfolgter Detektion der viralen RNA im Zytosol wird TBK1 rekrutiert und die Expression IFN-abhängiger Gene über IRF-3 induziert [46]. Dem kürzlich identifizierten Adapterprotein IPS-1 (interferon-beta promoter stimulator 1) wird ebenfalls eine Rolle im RIG-I bzw. MDA-5 vermittelten Signalweg zugeschrieben [47, 48]. So wird eine NF- κ B Aktivierung über IPS-1 postuliert, welche bereits durch *in vitro* Studien bestätigt werden konnte [14].

1.3. Bedeutung der TLR Signalwege in der Sepsis

Die Sepsis stellt mit 60.000 Todesfällen jährlich die dritthäufigste Todesursache in Deutschland dar. Bei dieser Erkrankung ist das Zusammenwirken der Infektion und der Immunantwort entscheidend. Eine Sepsis entwickelt sich, wenn es dem Organismus nicht gelingt, die Infektion auf den Entzündungsherd zu begrenzen. Durch Invasion der Pathogene (vorwiegend Bakterien) oder deren Toxine in die Blutbahn entwickelt sich eine systemische Reaktion. In den meisten Fällen geht sie von Lunge, Urogenitaltrakt oder Abdomen aus [49, 50]. Makrophagen spielen bei der systemischen Zytokin- und Chemokinproduktion eine essentielle Rolle. Der Großteil an gebildeten Entzündungsmediatoren kann eine Vielzahl paralleler Reaktionskaskaden auslösen. Überdies sind die gebildeten Zyto- und Chemokine teilweise in die gegenseitige Regulation involviert (endokrine und parakrine Effekte). In Abb. 4 sind die Mediatoren der Makrophagen und ihre Effektor-kaskaden in einer Übersicht dargestellt. Über Vasodilatation, gesteigerte Kapillarpermeabilität und Gerinnungsaktivierung führt die systemische Entzündungsreaktion zu lokaler Hypoperfusion und Hypotonie. Als Folge der massiven Aktivierung proinflammatorischer Kaskaden kommt es in fortgeschrittenen Stadien als kompensatorisches Ereignis zu einer Immunsuppression. Sie stellt oft auch die Ursache für die Entwicklung einer Sepsis dar. Erhöhte antiinflammatorische Zytokinproduktion und verstärkte Lymphozytenapoptose beeinflussen dabei unter anderem die Pathogenese der Sepsis. In der weiteren Verlaufsform kommt es schließlich zum Organschaden, dem der septische Schock und das Multiorganversagen folgen [1, 51].

Einleitung

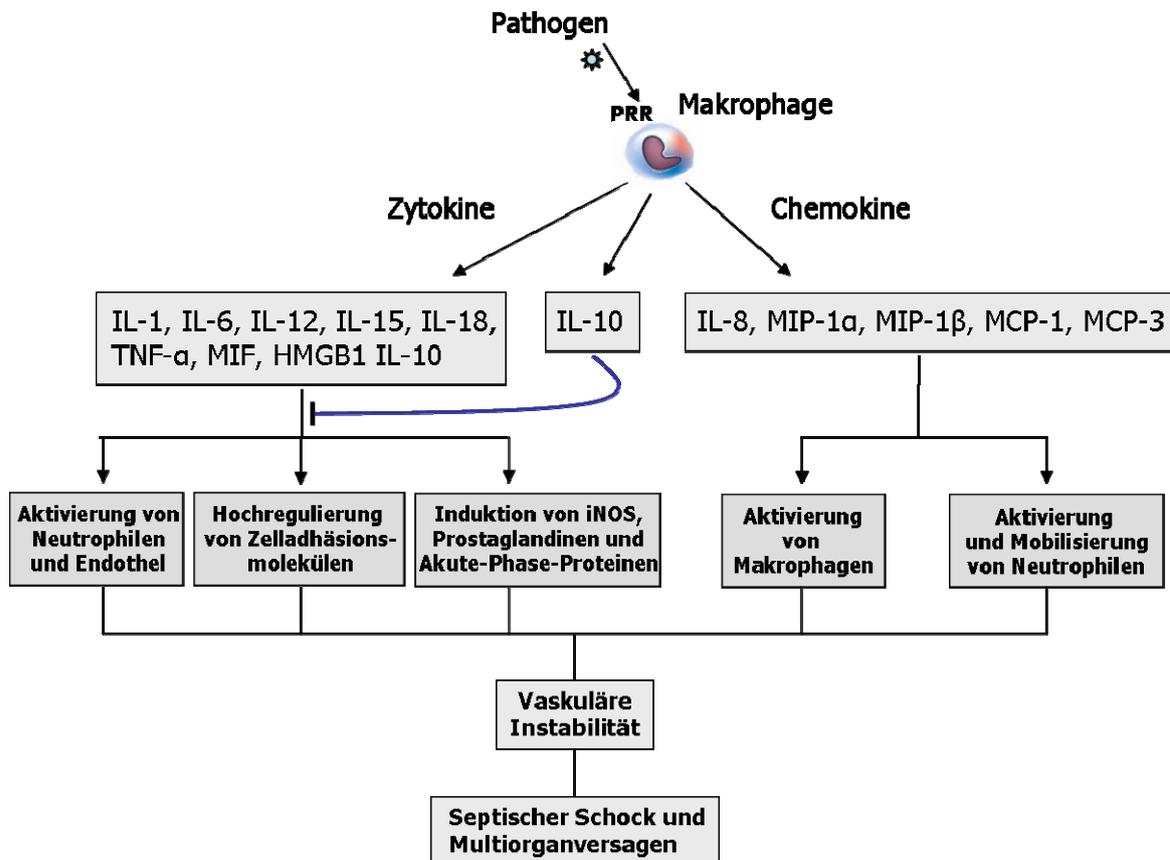


Abb. 4: TLR-induzierte Makrophagen-Mediatoren in der Pathogenese der Sepsis. Die TLR-induzierte Zytokin- und Chemokinproduktion in der Sepsis führt zu verschiedenen parallelen Reaktionskaskaden. Die Mediatoren sind dabei teilweise in die gegenseitige Regulation involviert. Das Zytokin IL-10 wirkt als Negativregulator der Effekte. PRR (pattern recognition receptors; Mustererkennungsrezeptoren), IL (Interleukin), MIF (macrophage migration inhibitory factor), HMGB1 (high mobility group B1), MIP-1 (macrophage inflammatory protein), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein)

Da Zytokine und Chemokine an der Pathogenese der Sepsis entscheidend beteiligt sind, ist die Untersuchung der involvierten TLR-Signalwege von zentraler Bedeutung.

Es existiert eine Vielzahl verschiedener Tiermodelle für die Sepsis, wobei das bakteriell infektiöse Modell der CASP (colon ascendens stent peritonitis) die klinische Situation der postoperativen abdominalen Sepsis nachstellt. Im Mausmodell der CASP wird eine polymikrobielle Peritonitis induziert, indem eine künstliche Verbindung zwischen Darmlumen und Peritonealhöhle geschaffen wird. Dazu wird ein Stent in die Darmwand eingenäht, wodurch ein kontinuierlicher Ausstrom der Darmbakterien ins Peritoneum erfolgt. Dadurch entsteht eine polymikrobielle Infektion, die den Ursprung der abdominalen Sepsis darstellt.

Einleitung

Untersuchungen TLR-defizienter Mäuse in diesem Modell zeigten, dass das Fehlen einzelner TLRs während der polymikrobiellen Infektion kompensierbar ist. TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} sowie Mäuse mit Defizienz für beide TLR-Rezeptoren zeigten ähnliche Überlebensraten wie Wildtyp [52]. Dagegen war die Überlebensrate MyD88-defizienter Mäuse in diesem Modell signifikant besser als die von Wildtypmäusen. Die Rekrutierung der Neutrophilen an den Entzündungsort sowie die Beseitigung von Bakterien war dabei vergleichbar mit Wildtypmäusen. Jedoch war in MyD88-defizienten Mäusen eine stark verminderte Produktion systemischer Zytokine während der polymikrobiellen Peritonitis zu beobachten, sie fehlte jedoch nicht vollständig. Dies lässt den Schluss zu, dass das Adapterprotein MyD88 eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der toxischen Hyperinflammations-Reaktion spielt. Die vergleichsweise geringen Zytokinmengen, die in MyD88-defizienten Mäusen noch gebildet wurden, scheinen ausreichend zu sein, um protektive Effekte hervorzurufen.

1.4. Zelltyp-spezifische Rolle der TLR-Signalwege

In MyD88-defizienten Mäusen wurde auch die lokale Zytokinproduktion in verschiedenen Organen nach Sepsis-Induktion untersucht. Die Zytokine TNF- α , IL-12 sowie IL-10 wiesen dabei eine organ-spezifisch unterschiedliche Produktion auf. Während in der Milz kein Einfluss von MyD88 auf die Zytokinproduktion zu beobachten war, konnte in Leber und Lunge eine starke Abhängigkeit von MyD88 nachgewiesen werden. Ebenso wurden im CASP-Modell die Chemokine MIP-2 (macrophage-inflammatory protein-2), und KC (cytokine-induced neutrophil chemoattractant) stark MyD88-abhängig in Leber und Lunge produziert, wohingegen die Produktion der Chemokine in der Milz MyD88-unabhängig war. Die verschiedenen Organe leisten folglich bezüglich der TLR-vermittelten Zytokinproduktion einen unterschiedlichen Beitrag zur Immunantwort. Ausschlaggebend ist dabei vermutlich die unterschiedliche Zusammensetzung der einzelnen Organe aus verschiedenen Zelltypen.

Die Ursachen, die zu einer differentiellen Signaltransduktion in den einzelnen Zelltypen führen können, sind dabei verschiedenster Natur. Ein deutliches Indiz stellen jedoch die unterschiedlichen Expressionsmuster der TLR-Rezeptoren auf verschiedenen Zelltypen bzw. unterschiedlich differenzierten Zellen dar (cDC, pDC) [12, 53]. Neben der Expression kann auch die Lokalisation der TLR-Rezeptoren zelltyp-spezifisch sein. Beispielsweise ist der TLR4 in Makrophagen und dendritischen Zellen an der Zelloberfläche lokalisiert, während er in Darmepithelzellen vorwiegend am Golgi-Apparat positioniert ist [54, 55]. Diese anatomische Lokalisation des TLR4 erlaubt den Darmepithelzellen die Diskriminierung zwischen invasiv-pathogenen und kommensalen Mikroorganismen [56]. Des Weiteren kann nicht nur die unterschiedliche Lokalisation der TLR-Rezeptoren,

Einleitung

sondern auch eine unterschiedliche Verweildauer der PAMPs in den verschiedenen intrazellulären Kompartimenten differenzierte Signalantworten hervorrufen. In pDC bleibt beispielsweise der TLR9-Ligand CpG länger im Endosom, als in cDC, in denen eine raschere Reifung zum Lysosom stattfindet. Da der MyD88-IRF7-Komplex jedoch in der endosomalen Membran lokalisiert ist, wird folglich in pDC über diesen Signalweg mehr Typ I IFN produziert als in cDC. In cDC hingegen erfolgt die Detektion viraler RNA vorwiegend über die zytoplasmatischen Proteine RIG-I und MDA-5 [57, 58]. In Endothelzellen beschränkt sich die differentielle Expression keineswegs auf TLR-Rezeptoren. Hier konnte auch bezüglich eines der Adapterproteine ein zelltyp-spezifischer Effekt beobachtet werden. Das Adapterprotein TRAM fehlt in Endothelzellen, so dass in diesem Zelltyp der TRIF-abhängige TLR4 Signalweg nicht aktiviert werden kann [59].

Eine weitere Ursache für die Entstehung differentieller Signale in unterschiedlichen Zelltypen bzw. Organen kann eine unterschiedliche Negativ-Regulation der TLR Signalwege sein. Die Tatsache, dass z.B. in der Milz vorwiegend die Splice-Variante von MyD88 (MyD88s) exprimiert wird, welche nach LPS-Stimulation als dominant negativer Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung fungiert, spricht für das Konzept einer MyD88-unabhängigen Zytokinproduktion in diesem Organ [60].

Die in der Sepsis pathologisch gesteigerte Zytokinproduktion nach Stimulation multipler TLR-Rezeptoren kann durch verschiedene Mechanismen begründet sein. Zum einen kann die Aktivierung mehrerer TLR Rezeptoren die Verstärkung einer Effektorsignaltransduktion [61, 62] oder aber die koordinierte Induktion verschiedener Signalantworten hervorrufen [63-65]. Zudem können dabei TLR-Rezeptoren verschiedener Zelltypen über parakrine Mechanismen interagieren, wobei eventuell nicht-hämatopoetische Zellen der einzelnen Organe die Signalwege der hämatopoetischen Zellen beeinflussen können [66].

Angesichts der beschriebenen Gegebenheiten ist es wichtig die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass sehrwohl eine unterschiedliche Zytokinproduktion abhängig vom Organ und Zelltyp als Antwort auf ein und denselben Stimulus erfolgen kann und dadurch der Verlauf einer Immunantwort oder auch Infektionskrankheit entscheidend beeinflusst werden kann.

Der TLR-induzierte Beitrag einzelner Zelltypen zur Immunantwort wurde bereits in einzelnen Arbeiten untersucht. Anhand von Knochenmarkchimären konnte gezeigt werden, dass der TLR4-Signalweg in Epithelzellen bzw. nicht-Hämatopoetischen Zellen der Blase essentiell ist für die Erreger-Beseitigung bei der *Escherichia coli*-induzierten Urogenitaltrakt-Infektion [67]. Die TLR4-Ligation auf hämatopoetischen Zellen hingegen ist in diesem Modell essentiell für die initiale inflammatorische Zytokinproduktion. Eine weitere Arbeit mit Knochenmarkchimären zeigte, dass im LPS-Schockmodell der TLR4-Signalweg in Endothelzellen bzw. nicht-hämatopoetischen Zellen für die Einwanderung der Immunzellen in die Lunge unentbehrlich ist [68].

Einleitung

Allerdings ermöglichen die Untersuchungen mit Knochenmarkchimären nicht die Analyse einzelner Zelltypen im Verlauf der Immunantwort, da in diesem System lediglich zwischen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen differenziert werden kann. Um den Beitrag einzelner Zelltypen zur Immunantwort gezielt untersuchen zu können, ist deshalb die Manipulation definierter Zelltypen in einem *in vivo* System erforderlich. Für derartige Anwendungen ist die konditionale Mutagenese das Mittel der Wahl, da hier mithilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems die Expression eines Gens gewebs- bzw. zelltyp-spezifisch deletiert oder induziert werden kann. Dazu werden zuerst *loxP*-Erkennungssequenzen, die ein Gen oder eine definierte insertierte Sequenz (Stopp-Kassette) flankieren, durch homologe Rekombination in das Genom eingeführt. Anschließend wird durch Kreuzung mit Mäusen, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines zelltypspezifischen Promotors exprimieren, die Zielsequenz zwischen den beiden *loxP*-Erkennungssequenzen deletiert. Auf diese Weise kommt es je nach Strategie zur Deletion oder Reexpression des Gens.

Durch Etablierung eines derartigen Systems wird es möglich, den Beitrag einzelner Zelltypen zur TLR-vermittelten Zytokinproduktion im Verlauf der Sepsis aufzuklären. Von besonderem Interesse ist dabei die Rolle von Makrophagen, denen derzeit bezüglich der Zytokinproduktion die Haupteffektorfunktion beigemessen wird. Außerordentlich interessant ist jedoch auch die Untersuchung der Endothelzellen mit einem derartigen *in vivo* System, da sie als erster Zelltyp im Organismus mit den im Blut zirkulierenden Erregern in Kontakt treten. Erwähnte Studien weisen Evidenzen auf, die dem Endothel neben Makrophagen eine Schlüsselrolle in der proinflammatorischen Immunreaktion übertragen.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Das System der Toll-like Rezeptoren (TLRs) ist ein zentraler Abwehrmechanismus der angeborenen Immunantwort. MyD88 stellt dabei das essentielle intrazelluläre Adaptorprotein für alle TLR-Signalwege mit der Ausnahme von TLR3 dar. In einem murinen Modell konnte gezeigt werden, dass Hyperinflammationsreaktion und Immunpathologie in der schweren Sepsis durch MyD88 vermittelt werden. Untersuchungen von MyD88-defizienten Mäusen nach Sepsis-Induktion zeigten außerdem eine differentielle Zytokinproduktion abhängig vom untersuchten Organ. Diesen organ-spezifischen Effekten liegt eine unterschiedliche Zusammensetzung der Organe aus verschiedenen Zelltypen zu Grunde. Da Zytokine und Chemokine entscheidend an der Pathogenese der Sepsis beteiligt sind, ist die Analyse der TLR-vermittelten Beiträge einzelner Zelltypen im Verlauf der Immunreaktion von zentraler Bedeutung. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit ein *in vivo* Modell etabliert werden, das die Untersuchung der zelltyp-spezifisch induzierten MyD88-abhängigen Zytokinproduktion ermöglicht. Das konditionale System der „switch-on“-Mutagenese (Anschalten eines Gens) sollte hierbei als strategische Grundlage dienen. Ziel war es durch homologe Rekombination pluripotenter embryonaler Stammzellen einen Mausstamm zu generieren, der eine Stopp-Kassette mit flankierenden *loxP*-Erkennungssequenzen im *MyD88*-Genlokus enthält. Durch anschließende Kreuzung dieses Stammes mit Mauslinien, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle von zelltyp-spezifischen Promotoren exprimieren, erfolgt die Reexpression von MyD88 in definierten Zelltypen, während die restlichen Zellen bzw. Gewebe MyD88-defizient bleiben. Mit Hilfe des etablierten Modells wird die detaillierte Analyse der TLR-induzierten Zytokinproduktion einzelner Zelltypen im Verlauf der Immunantwort möglich.

In einem weiteren Abschnitt dieser Arbeit sollte *in vitro* die zelltyp-spezifische Regulation der TNF- α Biosynthese in Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) eingehend analysiert werden, da Untersuchungen im Vorfeld dieser Arbeit auf eine Diskrepanz bezüglich der Produktion des Zytokins in den genannten Zelltypen hinwiesen. Der MyD88-unabhängige TLR4-Signalweg wird durch das Adapterprotein TRIF vermittelt. Bereits publizierte Untersuchung der Zytokinproduktion von Thioglykollat-Makrophagen einer Mutante, die eine funktionslose Form des TRIF-Proteins exprimiert, zeigten eine im Vergleich zu Wildtypzellen reduzierte Produktion von TNF- α nach TLR4-Stimulation [28]. Auf der anderen Seite jedoch zeigten Genexpressionsstudien, die in unserem Labor durchgeführt wurden, keinerlei Verlust der Zytokin mRNA nach TLR4-Simulation in DC dieser Mausmutante [69]. Da der Befund auf eine im Vergleich zu Makrophagen alternativ regulierte Produktion von TNF- α in DC hinweist, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Mechanismus für die zelltyp-spezifische Produktion dieses Zytokins aufgeklärt werden.

2. Material

2.1. Geräte und technisches Zubehör

7300 Real Time PCR System	ABI, Foster City, USA
Brutschränke	Heraeus, Hanau
CL-1000 UV crosslinker	UVP, Upland, USA
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Durchflußzytometer FACScalibur	BD PharMingen, San Diego, USA
Gel Doc XR System	Bio Rad, München
Gel Doc XR	Bio Rad, München
Gelkammer	Bio Rad, München
Geltrockner	Biometra, Göttingen
Gene Pulser II	Bio Rad, München
GeneAmp PCR-System 7900	ABI, Foster City, USA
GeneAmp PCR-System 9600	Perkin Elmer, Boston, USA
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
Impact ² -Pipette	Matrix, Wehrheim
Innova 4230 incubator shaker	New Brunswick. Edison, USA
Kodak Image Station 200R	Kodak, New York, USA
Mikroskope	Zeiss, Jena
Mithras LB940	Berthold, Bad Wildbad
Mixing Rotor	Renner, Darmstadt
NanoDrop [®] ND-1000	Nanodrop Techn., Montchanin, USA
Neubauer-Zählkammer	Brand, Berlin
Phosphoimager Storm 840	Molecular Dynamics, Krefeld
Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Vertikale Elektrophoreseeinheit	Fisher Scientific, Ulm
Waagen	Satorius, Göttingen
Wasserbäder	Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Heraeus, Hanau
ELISA Waschgerät	STL, Crailsheim

2.2. Chemikalien

Acrylamid	Bio Rad, München
Agar	DIFCO, Kansas, USA
Agarose	Invitrogen, Leek, NL
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Stammheim
Bacto-Trypton	BD PharMingen, San Diego, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Comassie Brilliant Blue R	Sigma-Aldrich, Stammheim
Complete Mini Protease inhibitor cocktail	Roche, Mannheim
CpG 2216	TIB, Berlin
Desoxynukleotide (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Stammheim
Dithiothreoxat	Sigma-Aldrich, Stammheim
dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
ECL Reagenz	Pierce, Bonn
EDTA	Roth, Karlsruhe
Eisessig	Sigma-Aldrich, Stammheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Stammheim
G418	Sigma-Aldrich, Stammheim
Ganciclovir	Sigma-Aldrich, Stammheim
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Glycine	Roth, Karlsruhe
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzerin	Sigma-Aldrich, Stammheim
Glyzin	Roth, Karlsruhe
GM-CSF	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Hefeextrakt	DIFCO, Kansas, USA
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid)	Sigma-Aldrich, Stammheim
Isopropanol	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Stammheim

Material und Methoden

L-Glutamin	Biochrom, Berlin
LPS (Salmonella minnesota)	List Biological Laboratories, Campbell, USA
Magic Mark Proteinstandard	Invitrogen, Leek, NL
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Stammheim
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Methothrexat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Stammheim
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Deoxycholat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumziträt	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natronlauge	Roth, Karlsruhe
NP-40	MP Biomedicals, Eschwege
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Invitrogen, Leek, NL
Orange G	Sigma-Aldrich, Stammheim
Pam ₃ Cys (Pyridin-2-Aldoxin-Methiodid-3-Cystein)	EMC, Tübingen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Stammheim
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, Stammheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Stammheim
Random Primer	Fermentas, St. Leon-Rot
ReBlot™ Plus Mild	Chemicon, Hampshire, UK
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Stammheim
RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
Salmon Sperm DNA	Invitrogen, Leek, NL
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
TEMED	Bio Rad, München
Thioglykolat	DIFCO, Kansas, USA
Triton X-100	Bio Rad, München
TRIZMA® Base	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, A
Trypton	Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

Tween 20	Roth, Karlsruhe
X-Gal (X-Galaktopyranosid)	Sigma-Aldrich, Stammheim
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

2.2.1. Radiochemikalien

[$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP redivue, GE Healthcare, München
spezifische Aktivität $\sim 3000\text{Ci/mmol}$, $T_{1/2} = 14,3\text{ d}$
Die Reagenzien wurden vor Ablauf der ersten Halbwertszeit eingesetzt.

2.3. Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Platinum Pfx DNA Polymerase	Invitrogen, Leek, NL
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Stammheim
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot
Reverse Transkriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot

Material und Methoden

2.4. Antikörper

2.4.1. Erstantikörper

Tab. 1:

Antikörper	Konjugat	Klon/Spezies	Referenz
Anti-Maus IkBa	unkonjugiert	Kaninchen	Cell Signaling Danvers, USA
Anti-Maus MAPKAP-2	unkonjugiert	Kaninchen	Cell Signaling Danvers, USA
anti-Maus MyD88 (CT)	unkonjugiert	Kaninchen	Stressgen
Anti-Maus p38 MAP Kinase	unkonjugiert	Kaninchen	Cell Signaling Danvers, USA
Anti-Maus Phospho-IkBa (Ser32)	unkonjugiert	Kaninchen	Cell Signaling Danvers, USA
Anti-Maus Phospho-MAPKAPK- 2 (Thr334)	unkonjugiert	Kaninchen	Cell Signaling Danvers, USA
Anti-Maus Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182)	unkonjugiert	Kaninchen	Cell Signaling Danvers, USA
Anti-Maus Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	unkonjugiert	Kaninchen	Cell Signaling Danvers, USA
Anti-Maus SAPK/JNK	unkonjugiert	Kaninchen	Cell Signaling Danvers, USA
Anti-Maus Gr1	PE	RB6-8C5/Ratte	BD PharMingen San Diego, USA
Anti-Maus CD11b	PE	M1/70.15/Ratte	BD PharMingen San Diego, USA
Anti-Maus F4/80	PE	CI:A3-1/Ratte	BD PharMingen San Diego, USA
Anti-Maus CD11c	APC	HL3/ armenischer Hamster	BD PharMingen San Diego, USA
Fc-Block: CD16/32	unkonjugiert	2.4G2/Ratte	Caltag, Burlingame, USA

Material und Methoden

2.4.2. Zweitantikörper

Tab. 2:

Antikörper	Konjugat	Klon/Spezies	Referenz
Anti-Maus IgG (H+L)	POX	Ziege	Jackson Cambridgeshire, UK
Anti-Kaninchen IgG (H+L)	POX	Ziege	Jackson Cambridgeshire, UK

2.4.3. Isotypkontrollen

Tab. 3:

Antikörper	Konjugat	Klon/Spezies	Referenz
Anti-TNP	PE	MPC-11/Ratte IgG2b	BD PharMingen San Diego, USA
Anti-TNP	APC	G235- 2356/Hamster IgG1	BD PharMingen San Diego, USA

2.5. Reagenzienkits

Nucleo Bond BAC Maxi Kit	BD PharMingen, San Diego, USA
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Plasmid purification Kit (Maxi)	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Rediprime™ II	GE Healthcare, München
RNase free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
mTNF- α ELISA	R&D, Minneapolis, USA
mIL-6 Duo Set ELISA	R&D, Minneapolis, USA
p38MAPKAP ELISA Kit	Biosource, Camarillo, USA
SYBR®Gene Polymerase Kit	ABI, Foster City, USA

Material und Methoden

2.6. Sonstige Verbrauchsmaterialien

Dialyseschlauch SpectraPhor	Serva, Heidelberg
GB003 Gelblotting paper	Schleicher & Schuell, Dassel
GB005 Gelblotting paper	Schleicher & Schuell, Dassel
Protran	Schleicher & Schuell, Dassel
Genescreen Plus	Perkin Elmer, Boston, USA
Kanülen	B. Braun, Melsungen
MicroSpin S-200HR columns	GE Healthcare, München
Nitrozellulose Transfer Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Parafilm M	Am. Nat. Can TM , Chicago, USA
Plastikwaren	FALCON, Heidelberg
Spritzen	BD PharMingen, San Diego, USA
Sterilfilter	Satorius, Göttingen

2.7. Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Metabion, Planegg-Martinsried

Oligonukleotide zur Generierung des Targetvektors:

Tab. 4:	
Oligoname	Sequenz (5' → 3')
MyDsa-I1XhoI-sense	ATC ATC C TC GAG CTG TCA GTA TGC AGG TCA GC
MyDsa-I1SalI-antis.	ATC ATC G TC GAC GGT AAG AGC ACT GAC TGC TC
MyDla1-I1AscI-sense	ATC ATC GG C GCG CCG GCT GAG CCA TCT CGC CAG
MyDla1-E6StuI-antis.	ATC ATC CCA AAG CAG GCC TAA GCT TAC
MyDla2-E6StuI-sense	ATC ATC GTA AGC TTA GG C CTG CTT TGG
MyDla2-E6AscI-antis.	ATC ATC GG C GCG CCG CTA TCA TGT TTG GGG CCT TC
MyDsa-screen-sense	GTG GAA TTG TGA GCG GAT A
MyDsa-screen-antis.	GTC CTC CAG TCT CCT CCA C
MyDla-screen-sense	GAC AGC TCC CAA GGA TAG CTG
MyDla-screen-antis.	GGG ACC ATG ACA TTG CCT C

Material und Methoden

Oligonukleotide zur Generierung der Sonden für die Southern Blot-Analyse:

Tab. 5:

Oligoname	Sequenz (5'→ 3')
MyDsa-sense	GTC AGT ATG CAG GTC AGC GTA GG
MyDsa-antisense	AAG TCA GCC TGC TTC TCT GAG C
neoSonde-sense	C CTG ATG CTC TTC GTC CAG ATC
neoSonde-antis.	G CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC
lacZSonde-sense	G TGC ACG GCA GAT ACA CTT GCT
lacZSonde-antis.	C GAT ATT CAG CCA TGT GCC TTC T
MyDEx6Sonde-sense	CAT CCC CTA CCC CCA GAA AA
MyDEx6Sonde-antis.	CTC TAA CAC AGG TGG AGG AGG TTT

Oligonukleotide zum Screening der ES-Zell-Klone und Genotypisierung der MyD88^{stp/stp} Mäuse:

Tab. 6:

Oligoname	Sequenz (5'→ 3')
MyDEx1-sense	CTA GCC TTG GCA TAT TAA TCT TG
MyDIntron1-antis.	GAA GGG TGT AGA GGC TCC TC
MyDStop-antis.	CTG AAG AGG AGT TTA CGT CCA G

Oligonukleotide für die RT-PCR:

Tab. 7:

Oligoname	Sequenz (5'→ 3')
Aktin-sense	ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC
Aktin-antis.	AGC CAA GTC CAG ACG CAG G
TNF-alpha-sense	AAA ATT CGA GTG ACA AGC CTG TAG C
TNF-alpha-antis.	GTG GGT GAG GAG CAC GTA G

Material und Methoden

2.8. Klonierungsvektoren/Plasmide

Tab. 8:

Plasmidname	Herkunft
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Invitrogen, Leek, NL
pBSlacZTK	Sandra Beer, Düsseldorf
pBKCMV 129sv	Stratagene, La Jolla, USA
pEGFP	Clontech, Palo Alto, USA
pIC-Cre	Sandra Beer, Düsseldorf
TK44neo	Monika Semmrich, München

2.9. Stammlösungen und Puffer

Perfect HybTMPlus Hybridisierungspuffer

Sigma-Aldrich, Stammheim

TNE-Puffer:

10 mM Tris pH 8.0
100 mM NaCl
1 mM EDTA

TE-Puffer:

10 mM Tris pH 7.5
1 mM EDTA pH 8.0

SNET-Puffer:

20 mM Tris pH 8.0
5 mM EDTA pH 8.0
400 mM NaCl
1% (w/v) SDS
400 µg/ml Proteinase K

Erythrozyten-Lysepuffer:

155 mM NH₄Cl
10% (v/v) Tris-HCl
pH 7.2

RIPA-Puffer:

50 mM Tris/Cl
150 mM NaCl
1 mM EDTA
1% (w/v) NP-40
0,25% (w/v) Na-Deoxycholat
pH 7.4

Material und Methoden

50 x TAE-Puffer:	2 M	Tris
	0,05M	EDTA pH 8.0
	1 M	Eisessig
	pH 8.5	
DNA-Auftragspuffer: (5x)	1 ml	10x TAE
	1 ml	Orange G (10 mg/ml)
	1 ml	Glyzerol
	3 ml	H ₂ Odd
SDS-Probenpuffer (2x):	30% (v/v)	Glyzerol
	4% (w/v)	SDS
	0,5 M	Tris
	0,5% (w/v)	Bromphenolblau
	5% (v/v)	β-Mercaptoethanol
5 x TBST-Puffer:	2,5 M	NaCl
	100 mM	Tris/Cl pH7.4
	0,25% (v/v)	Tween 20
	1% (v/v)	Triton X 100
10 x Transblot:	480 mM	Tris
	390 mM	Glycin
	20% (v/v)	Methanol
10 x Laufpuffer:	248 mM	Tris/HCl pH 7.5
	1,9 M	Glycin
	1% (w/v)	SDS
Comassie-Lösung:	0,025% (w/v)	Comassie Brillant Blue R
	40% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Essigsäure
Entfärbelösung:	40% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Essigsäure
	50% (v/v)	H ₂ Odd

Material und Methoden

Ponceau S	0,2% (w/v) 5% (v/v)	Ponceau S Trichloressigsäure
20 x SSC-Puffer:	3 M 0,3 M pH 7.0	NaCl Na-Citrat x 2H ₂ O
Depurinierungslösung:	0,2 N	HCl
Denaturierungslösung:	0,5 M 1,5 M	NaOH NaCl
Neutralisierungslösung :	0,5 M 3 M pH 8.0	Tris NaCl
Waschlösung I: (Southern)	2x 0,1% (w/v)	SSC SDS
Waschlösung II: (Southern)	0,5x 0,1% (w/v)	SSC SDS
Stipping-Lösung: (Southern)	0,2 M 0,1% (w/v)	NaOH SDS

2.10. Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium:	1,0% (w/v) 0,5% (w/v) 1,0% (w/v) 0,5% (v/v) pH 7.2	Bacto-Trypton Hefeextrakt NaCl 1 N NaOH-Lösung
-------------------	--	---

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

Material und Methoden

S.O.C.-Medium:	2,0% (w/v)	Trypton
	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgSO ₄
	10 mM	MgCl ₂

2.11. Medien für die Zellkultur

RPMI	Biochrom, Berlin
PBS	Biochrom, Berlin
DMEM	Invitrogen, Leek, NL
MEM	Invitrogen, Leek, NL
FCS (ES-Zellen)	PAN, Aidenbach
FCS	MP, Illkirch, F
M2 Medium	Sigma-Aldrich, Stammheim

Tab. 9:

	Zelltypen					
	ES	EF	DC	thio-MΦ	Milz-Zellen	CHO-LIF-D
Basis-medium	DMEM	DMEM	RPMI 1640	RPMI 1640	RPMI 1640	MEM
FCS	15% (v/v)	5% (v/v)	10% (v/v)	10% (v/v)	10% (v/v)	10% (v/v)
L-Glutamin	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Penicillin	100 U/ml	100 U/ml	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	100 U/ml	100 U/ml
β-ME	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM
LIF	0,05% (v/v)					
GM-CSF	2% (v/v)					

Material und Methoden

2.12. Bakterien

Tab. 10:

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E.coli</i> TOP10	F-, mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, araD139, Δ (ara-leu)7697, galU, galk, rpsL, endA1	Invitrogen Leek, NL

2.13. Zelllinien

Tab. 11:

Zelllinie	Herkunft	Referenz
ES-Zellen E14.1	murine embryonale Stammzellen (129SvJ)	A. Joyner, Toronto, CDN
EF-Zellen	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 postcoitum aus CD1 Embryonen	Primärkultur
myeloide DC	Kultivierung aus Knochenmarks-Vorläuferzellen mit GM-CSF	Primärkultur
thio-M Φ	Primäre Makrophagen aus Peritoneallavage nach Thioglykollatinjektion	Primärkultur
Milzzellen	Primäre Milzzellen, kultiviert nach Organhomogenisierung und Erythrozytenlyse	Primärkultur
CHO-LIF-D	LIF-exprimierende Ovarzelllinie aus dem Chinesischen Hamster	Klaus Pfeffer, Düsseldorf

2.14. Versuchstiere

Alle Mäuse wurden im spezifisch pathogenfreien (SPF) Bereich des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München gezüchtet und gehalten.

Tab. 12:

Mausstamm	Herkunft
C57BL/6	Harlan-Winkelmann, Borchten
CD1	Charles River, Wilmington, USA
129Sv	eigene Zucht
LPS2 ^{-/-}	Bruce Beutler, La Jolla, USA
MyD88 ^{-/-}	Shizuo Akira, Osaka, Japan

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Enzymatische Behandlung von DNA

3.1.1.1. Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage vier bis acht Basenpaare in einem DNA-Strang zu erkennen und diese Zielsequenz spezifisch zu spalten. Der Restriktionsverdau von DNA diente entweder zum Nachweis bestimmter DNA-Fragmente oder dem Umklonieren von DNA-Fragmenten. Standardmäßig wurde der Verdau in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt. Ein bis 5 units Enzym/µg DNA wurden unter den entsprechenden Pufferbedingungen eingesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass auf je 10 µl Reaktionsansatz nur 1 µl Enzym eingesetzt wurde um die inhibitorische Wirkung des Glycerins im Enzymverdünnungspuffer zu verringern. Der Verdau wurde 2 h bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden die verdauten DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das Bandenmuster analysiert.

3.1.1.2. Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase katalysiert die Abspaltungsreaktion von Phosphatgruppen am 5'-Ende der DNA. Um Religationen des Vektors nach Verdau zu vermeiden wurde die Alkalische Phosphatase eingesetzt, um das von der Ligase benötigte Phosphat abzuspalten. Eingesetzt wurden 0,5 units Alkalische Phosphatase pro µg Vektor-DNA. Nach Zugabe des 10x Puffers wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und der Ansatz bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die Reinigung des Vektors erfolgte mittels des PCR Purification Kits von Qiagen (Hilden, D).

3.1.2. Ligation

Sämtliche Ligationen wurden mit der T4 Ligase (Fermentas) durchgeführt. Vektor und Insert wurden meist (außer bei der Klonierung des kurzen Armes) in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt, wobei eine Gesamtmenge von 100 ng DNA nicht überschritten wurde. Das Volumen des Gesamtansatzes betrug jeweils 20 µl. Als Puffer wurde ein 2-fach Ligasepuffer eingesetzt. Die Ligation wurde 16 h bei 16°C durchgeführt. Zwei µl (ca. 5 ng) des Ligationsansatzes wurden in die anschließende Transformation eingesetzt.

3.1.3. Topo TA-Klonierung

Mit dem TOPO TA-System ist es möglich PCR-Produkte, die mittels Taq-Polymerase amplifiziert wurden, direkt in einen Vektor zu klonieren. Der dafür vorgesehene Vektor liegt in linearisierter Form mit 3'-Desoxythymidin-Überhängen vor. Die Taq-Polymerase besitzt eine terminale Transferaseaktivität, die an 3'-Enden der Amplifikate einzelne Deoxyadenosine anhängt. Diese Adenosine hybridisieren mit den 3'-Desoxythymidinen des Vektors. Eine kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase I bindet an die doppelsträngige DNA des PCR-Produktes und ermöglicht so eine spontane Ligation.

Durch Transformation wurden Topo TA-klonierte Plasmide in kompetente *E.coli*-Zellen übertragen. Da der verwendete Vektor pCR2.1-TOPO das Gen für β -Lactamase enthält, können nur solche Bakterien auf Ampicillin-Agarplatten anwachsen, die das Plasmid aufgenommen haben. Da das Reportergen für β -Galaktosidase (*lacZ*) die multiple Klonierungsstelle (MCS) enthält, konnte mittels der sogenannten Blau-Weiß-Selektion auf X-Gal enthaltenen Agarplatten vorselektioniert werden. Die Aufnahme eines intakten Plasmides führt zu einer Ampicillin-Resistenz der Zellen und zur Spaltung des farblosen Substrates X-Gal in das blaue Produkt. Der Einbau eines Inserts in die MCS zerstört das Leseraster des *LacZ* Gens. Die mit dem Insert transformierten Bakterienkolonien bleiben in Anwesenheit von X-Gal farblos.

3.1.4. Transformation von *E.coli* Bakterien

50 μ l kompetente *E.coli* K12 DH5 α (One Shot[®] Top 10) wurden langsam auf Eis aufgetaut und zu 2 μ l des jeweiligen Ligationsansatzes pipettiert. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock bei 42°C. Die Inkubationszeit betrug 45 sec. Die Bakterien wurden anschließend auf Eis abgekühlt, mit 450 μ l S.O.C. Medium versetzt und 1 h bei 37°C in einem Inkubator (225 UpM) geschüttelt. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen der Kultur auf jeweils eine LB-Platte mit Ampicillin ausgestrichen und 16 h bei 37°C inkubiert. Kolonien wurden per Colony-PCR "gescreent" und positive Klone zur Plasmidpräparation in LB-Medium angezogen.

3.1.5. Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation kleinerer Mengen an Plasmid-DNA (**Minipräp**) wurden 2 ml LB-Medium mit Bakterien beimpft und anschließend bei 225 UpM und 37°C für 16 h im Schüttler kultiviert. Die Selektion erfolgte durch Zugabe von Ampicillin (100 μ g/ml) bzw. Kanamycin (100 μ g/ml), da die Bakterien eine plasmidvermittelte Resistenz gegen jeweils eines der Antibiotika besitzen.

Material und Methoden

Nach Kultivierung wurden die Bakterien bei 5.000 g pelletiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep-Kit isoliert.

Um größere Mengen an Plasmid-DNA (**Maxipräp**) zu erhalten wurden zunächst 2 ml LB-Medium mit Bakterien beimpft und 8 h kultiviert. Diese Vorkultur diente anschließend zum Beimpfen einer 400 ml LB-Kultur, die 16 h bei oben genannten Bedingungen im Schüttler kultiviert wurde. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert und die DNA mit Hilfe des QIAquick Plasmid purification Kit (Maxi) isoliert. Die Präparation größerer Plasmide (> 10kb) erfolgte mit dem Nucleo Bond BAC Maxi Kit. Die DNA-Isolierung erfolgte jeweils nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer und Lösungen.

3.1.6. Isolierung chromosomaler DNA aus ES-Zellen

Zellen einer 10 cm Zellkultur-Schale wurden durch Trypsin-Behandlung abgelöst und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 500 µl TNE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl SDS sowie 7,5 µl Proteinase K (1mg/ml) wurde die DNA über Nacht bei 56°C verdaut.

Der Verdau wurde dann bei 13 000 UpM 5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diesem wurde 500 µl eines Phenol/Chloroform-Gemisches (1:1) zugefügt. Der Ansatz wurde anschließend 10 min bei 14000 UpM bei RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß mit 900 µl Ethanol überführt. Nach kräftigem Schütteln wurde die gefällte DNA vorsichtig mit einer Pipettenspitze herausgehäkelt, kurz in 70%-igem Ethanol gewaschen und in einem Reaktionsgefäß mit 200 µl TE-Puffer gelöst.

3.1.7. Isolierung chromosomaler DNA aus Mausschwanz-Biopsien

Mausschwanz-Biopsien wurden in 1,5 ml SNET-Puffer über Nacht bei 56°C inkubiert. Dem Ansatz wurde 1,5 ml eines Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Gemisches zugegeben und dieser 30 min unter Schütteln inkubiert. Nach einem 7 minütigen Zentrifugationsschritt bei 660 g (RT) wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ein Volumen Isopropanol wurde dem Ansatz zugefügt. Anschließend wurde 25 min bei 10000 UpM bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet getrocknet war wurde es in 500 ml TE-Puffer gelöst.

3.1.8. Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Lipid- und Proteinbestandteile aus den DNA-Präparationen zu entfernen, wurde standardmäßig eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Den Ansätzen wurde das 2-fache Probenvolumen einer Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) zugegeben und diese durch Vortexen gemischt. Durch Zentrifugation bei 14000 g für 5 min erfolgte eine Phasentrennung. Die obere wässrige Phase, welche die DNA enthielt, wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das 2-fache Volumen an Chloroform zugegeben. Nach erneutem Vortexen wurde 5 min bei 14000 g zentrifugiert und die nun Phenol-freie wässrige DNA-Lösung abgenommen.

3.1.9. Ethanolfällung der DNA

Um umzupuffern bzw. die DNA in ein geringeres Volumen zu überführen, ist die Ethanolfällung das Mittel der Wahl. Hierfür wurde dem Ansatz 1/10 Probenvolumen 3 M NaAc sowie das 2,5-fache Probenvolumen 100%-iges Ethanol (-20°C) zugegeben und 2 h bei -20°C inkubiert. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation bei 4°C und 14000 g 25 min pelettiert. Nachdem der Überstand abgenommen war, wurde mit 600 μl 70%-igem Ethanol (-20°C) gewaschen. Nach erneutem 10-minütigen Zentrifugieren bei 4°C und 14000 g wurde der Überstand verworfen, die DNA 5-10 min in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet und anschließend in dem jeweils benötigten Puffer aufgenommen.

3.1.10. Quantifizierung der DNA und RNA

Die Quantifizierung der DNA und RNA erfolgte mittels Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Für die Messung am NanoDrop[®] ND-1000 wurde 1 μl der Probe eingesetzt. Um zusätzlich Aussagen über eventuelle Proteinkontaminationen machen zu können wurde ebenfalls bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und der Quotient aus beiden OD-Werten ($\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$) bestimmt.

3.1.11. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von DNA-Molekülen in einem konstanten elektrischen Feld. Die Agarose dient hierbei als interne Matrix, in welcher DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen (im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrad) im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch verschiedene Faktoren wie Molekülgröße,

Material und Methoden

Konformation der DNA, Agarosekonzentration und die angelegte Spannung beeinflusst. Bei linearer doppelsträngiger DNA verhält sich die Laufgeschwindigkeit indirekt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Die eingesetzte Agarosekonzentration ist abhängig von dem DNA-Molekulargewichtsbereich, in dem eine effektive Auftrennung der Fragmente erfolgen soll. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde im TAE-Puffersystem durchgeführt.

Standardmäßig wurden 1%-ige (w/v) Agarosegele verwendet. Agarose wurde unter Aufkochen in TAE-Puffer gelöst und nach dem Abkühlen Ethidiumbromid (50 ng/ml) zugefügt. Anschließend wurde das Gel in die Gelkammer mit Schlitten gegossen und nach Erstarren des Gels diese mit TAE-Puffer befüllt. Die DNA-Proben wurden mit 5x Probenpuffer (Orange G) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Um nach Abschluss des Gel-Laufes die Länge und Menge der aufgetragenen DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein Referenzmarker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit einer Feldstärke von 5 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und lässt sich aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften bei UV-Licht sichtbar machen. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden durch einen Transilluminator visualisiert und mittels eines digitalen Videosystems dokumentiert.

3.1.12. DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Nach Amplifikation diverser DNA-Fragmente mittels PCR mussten diese für nachfolgende Klonierungsschritte aus Agarose-Gelen isoliert werden. Die Isolation wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

3.1.13. DNA-Amplifikation durch PCR (polymerase chain reaction)

Das Prinzip der PCR (polymerase chain reaction) ist die enzymatische Amplifikation eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Die eingesetzte DNA wird zunächst bei 94°C denaturiert. Im folgenden Hybridisierungsschritt lagern sich die Oligonucleotid-Primer bei einer Temperatur (Annealing-Temperatur), die für jedes Primer-Paar optimiert werden muss, an die DNA-Einzelstränge an. Bei einer Temperatur von 72°C erreicht die Polymerase optimale Bedingungen für die Synthese in 3'-5'-Richtung. Diese Elongationsphase ist der letzte Schritt eines Zyklus und wird zeitlich an die Fragmentlänge und Aktivität der Polymerase angepasst. Im Normalfall werden 20-40 Zyklen durchlaufen. Heutzutage werden hitzestabile Polymerasen verwendet, die aus extremophilen Archaeobakterien isoliert werden (z.B. Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*).

Material und Methoden

Für die Amplifikation von DNA-Abschnitten bis zu 500 bp wurde die Taq-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Für größere Fragmente wurde die Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen, NL) eingesetzt. Die Polymerase wurde jeweils in einer Konzentration von 0,05 units/ μ l eingesetzt. Das Volumen eines Reaktionsansatzes betrug 50 μ l. Es wurden jeweils 5 μ l des vom Hersteller vorgegebenen 10x Puffers sowie 20 mM dNTPs und jeweils 1 nmol Oligonukleotid-Primer eingesetzt. Hinzu kam 0,002-0,01 μ g/ μ l „Template“-DNA bzw. bei Colony-PCR eine gepickte Kolonie. Die verwendeten PCR-Programme sind in Tab. 13 aufgeführt. Standardmäßig wurden 35 Zyklen amplifiziert.

Tab. 13:	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	
		Taq	PlatinumPfx
Initiation	94	300	300
Denaturierung	94	60	60
Hybridisierung	AT	45	45
Elongation	72/ 68	45	120
Terminale Elong.	72	420	420

3.1.14. Quantitative RT-PCR („real-time“-PCR)

Die RT-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und bietet zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung. Durch Verwendung eines fluoreszierenden Reporterfarbstoffes, der in die doppelsträngige DNA interkaliert, kann die Reaktion verfolgt werden. Mit fortschreitender PCR-Reaktion kommt es zu einem Fluoreszenzanstieg, der direkt proportional zur Zahl der vorhandenen Doppelstränge ist und über ein optisches Detektionsmodul online gemessen wird. Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, den sogenannten Threshold Cycle oder C_T -Wert. Der C_T -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt.

Die Taqman RT-PCR wurde eingesetzt um über die Menge der gebildeten cDNA eine direkte quantitative Aussage über die im Ausgangsmaterial vorhandenen Menge an mRNA machen zu können. Hierzu wurden standardmäßig 250 ng „Template“-cDNA eingesetzt und das Produkt jeweils ins Verhältnis zu dem „Housekeeping“-Gen β -Aktin gesetzt.

Material und Methoden

Ein PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 15 µl SYBR® Green Master Mix
- 5 µl DNA (0,1 µg/µl)
- 1 µl Primer1 (20 pmol)
- 1 µl Primer2 (20 pmol)
- 8 µl H₂O

PCR-Bedingungen:

50°C	2 min	} 40 Zyklen
95°C	10 min	
95°C	15 sec	
60°C	1 min	

Durch eine zusätzliche Schmelzpunktanalyse nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde überprüft, ob Fehlhybridisierungen (Primer-Dimere) stattgefunden haben.

3.1.15. Präparation von RNA aus Primärzellen

Für die Präparation hochreiner RNA wurde eine Isolierung über Affinitätschromatographie durchgeführt.

Die Zellen wurden geerntet, gewaschen und anschließend in 350 µl RLT-Puffer (incl. 1% (v/v) β-Mercaptoethanol) aufgenommen und gelöst. Die Probe wurde homogenisiert, indem das Lysat mindestens 5 mal durch eine 20 G Kanüle gezogen wurde. Die weitere RNA-Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit mit einem zusätzlichen DNase-Verdau (RNase free DNase Set) um DNA-Kontamination zu verhindern. Die Elution der RNA erfolgte mit 30 µl RNase freiem H₂O.

3.1.16. cDNA-Synthese

Bei der komplementären DNA (cDNA) handelt es sich um eine Kopie der mRNA, die mit Hilfe eines retroviralen Enzyms, der reversen Transkriptase, in DNA umgeschrieben wird. Für die cDNA-Synthese wurden 1-2 µg RNA in einem Volumen von 38 µl eingesetzt. Als Primer dienten synthetische Oligonukleotide, die sich spezifisch an den poly-A-Schwanz der mRNA anlagern. In einem ersten Schritt wurde die mRNA mit jeweils 1 µl Oligo-dT-Primer (10 µM) und 1 µl random hexamer-Primer (20 ng) versehen und für 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt, um Sekundärstrukturen in der RNA aufzulösen. Nach Zugabe von 8 µl 5x Transkriptionspuffer, 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl RNase-Inhibitor (40 unit) und 2 µl Reverse Transkriptase (400 unit) wurde der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur vorinkubiert bevor bei einer einstündigen Inkubation bei

Material und Methoden

42°C das Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgte. Die Reaktion wurde durch Denaturierung des Enzyms gestoppt, indem der Ansatz für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt wurde. Die so erhaltene cDNA wurde als „Template“ für RT-PCRs eingesetzt.

3.1.17. Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde von den Firmen GATC, Konstanz sowie Medigenomics, Martinsried durchgeführt.

3.1.18. Southern Blot

Die Methode des Southern Blots zielt darauf ab, DNA-Fragmente, die mittels Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt wurden, auf einer Membran zu fixieren, um anschließend durch Hybridisierung markierter Sonden einzelne Fragmente spezifisch nachweisen zu können. In diesem Fall wurden radioaktiv markierte Sonden verwendet um eine hohe Sensitivität zu ermöglichen.

Zunächst wurden 10 µg genomische DNA mit dem jeweils notwendigen Restriktionsenzym über Nacht verdaut. Die Ansätze wurden anschließend mit Ethanol gefällt, mit Probenauftragspuffer versetzt und in einem 0,8% igen Agarosegel bei 19-25 V über Nacht aufgetrennt. Bevor nun die aufgetrennten DNA-Moleküle auf eine Nylonmembran geblottet werden konnten, mussten das Gel sowie die Membran entsprechend vorbehandelt werden. Das Gel wurde zunächst 10 min in 0,2 N HCl geschwenkt. Dies führt zur partiellen Depurinierung der DNA woraus Strangbrüche resultieren. Nach 30 minütiger Denaturierung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) wurde anschließend 30 min neutralisiert (0,5 M Tris, 3 M NaCl; pH 8.0). Die Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und zunächst für eine Minute mit destilliertem Wasser benetzt und anschließend für 15 min in 10 x SSC-Puffer geschwenkt.

Für den Transfer wurde eine Glasplatte so auf eine mit Transferpuffer befüllte Wanne gelegt, dass ein Filterpapierstreifen (GB005 Gelblotting Papier), der quer über die Platte plaziert wurde auf beiden Seiten Zugang zum Pufferreservoir hatte. Das Gel wurde nun mit der Vorderseite auf diesen Filterpapierstreifen gelegt, an den Rändern mit Parafilmstreifen abgedichtet und mit der Hybond N⁺-Nylonmembran luftblasenfrei bedeckt. Auf die Membran wurden drei in Transferpuffer getränkte GB003 Gelblotting Papiere gelegt. Es folgte eine Schicht bestehend aus drei weiteren GB003 Gelblotting Papieren sowie einem ca. 15 cm hohen Stapel Zellstoff. Dieser Aufbau (siehe Abb. 5) wurde mit einer Glasplatte und 500 g Gewicht beschwert.

Material und Methoden

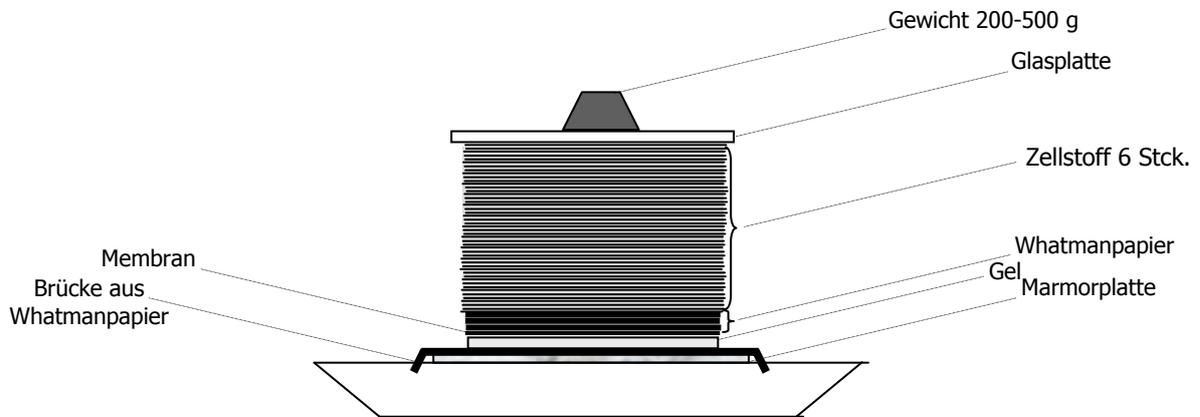


Abb. 5: Blot-Aufbau für den Southern Blot. Aufbau zum Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran.

Der Transfer der DNA erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Membran in 2x SSC-Puffer geschwenkt. Durch UV-Kreuzvernetzung im Crosslinker wurde die transferierte DNA auf der Membran fixiert. Nachdem die Membran in ein Hybridisierungsröhrchen überführt war wurde diese zunächst für 2 h bei 65°C mit 30 ml Prähybridisierungslösung unter Rotieren inkubiert. Der Hybridisierungslösung wurden 300 µl denaturierte Lachssperma-DNA (10 mg/ml) zum Blockieren unspezifischer DNA-DNA-Wechselwirkungen zugesetzt.

Als Sonde wurden 20-30 ng gereinigte DNA-Sonde mit Hilfe des Rediprime-Kits nach Anleitung des Herstellers mit 50 µCi ^{32}P -dCTP markiert und die nicht eingebauten Nukleotide mit einer MicroSpin S-200 HR-Säule von der markierten Sonde getrennt. Die DNA wurde anschließend 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis gestellt um Einzelstrang-DNA zu erhalten und zur Hybridisierungslösung zugegeben, nachdem 20ml derselben verworfen wurden. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C unter Rotieren über Nacht. Ungebundene Sonden-DNA wurde anschließend durch zwei Waschschriffe mit 2x SSC-Puffer; 0,1% (w/v) SDS (10 min) und einem folgendem Waschschriff mit 0,5x SSC-Puffer; 0,1% (w/v) SDS (10 min) entfernt. Spezifisch gebundene Radioaktivität wurde durch Detektion mit Hilfe des Phosphoimagers dokumentiert.

Zur Entfernung der spezifischen radioaktiven Sonde wurde der Blot zunächst mit H_2O gewaschen und anschließend 30 min bei 37°C in Strippingpuffer unter Schütteln inkubiert. Nach Equilibrierung in 2x SSC konnte der Blot erneut prähybridisiert und mit einer weiteren Sonde hybridisiert werden.

3.2. Zellbiologische Methoden

3.2.1. Zellkultur

Sämtliche Zellkulturarbeiten erfolgten ausschließlich unter einer Umluft-Sterilbank. Die Zellen wurden in dem jeweils benötigten Medium aufgenommen und im Brutschrank bei 37°C, 7% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Zellablösung adhärenter Zellen erfolgte durch Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung. Nach Inkubation für 10 min bei 37°C im Brutschrank wurde die Reaktion durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt und die Zellen wurden in der gewünschten Verdünnung neu ausgesät.

3.2.1.1. Kultivierung embryonaler Stammzellen (ES)

Um die notwendigen Wachstumshormone zur Verfügung zu stellen wurden die embryonalen Stammzellen (ES) grundsätzlich auf mit Mitomycin C vorbehandelten embryonalen Fibroblasten (EF) kokultiviert. Optimale Kultivierung der Zellen war erforderlich um das Ausdifferenzieren der ES-Zellen zu vermeiden. Hierfür wurde dem Medium zusätzlich LIF-Überstand zugegeben. Undifferenzierte ES-Zellen erscheinen unter dem Mikroskop als spindelförmige Zellklone mit einem glatten, hellscheinenden Rand, während ausdifferenzierte Zellkolonien matt und abgeflacht sind und Pseudopodien ausbilden.

3.2.1.2. Kultivierung embryonaler Fibroblasten (EF)

Embryonale Fibroblasten werden nach dem Auftauen auf 15 cm Zellkultur-Schalen ausgesät und konfluent wachsen gelassen. Sie können dann bis zu 4 mal passagiert werden. Vor Kokultivierung mit ES-Zellen wurden sie jeweils 2,5 h mit Mitomycin C (10 µg/ml) behandelt und dreimal mit PBS gewaschen. Mit Mitomycin C behandelte EF-Zellen können maximal 3 Tage verwendet werden.

3.2.1.3. Kultivierung von CHO-Zellen

Die CHO-Zellen wurden in 10 cm Zellkultur-Schalen kultiviert und alle 2-3 Tage im Verhältnis 1: 3 auf neue 10 cm Zellkultur-Schalen verteilt.

3.2.1.4. Kultivierung von dendritischen Zellen (DC) aus Knochenmark

Myeloide dendritische Zellen wurden durch Differenzierung mit dem Zytokin GM-CSF generiert. Nach der Knochenmarkspräparation (siehe Abschnitt 3.5.7.) wurden 7×10^6 Zellen pro ml Medium ausgesät und mit 20 µg/ml GM-CSF für 10 Tage in Kultur genommen, wobei am Tag 3, 6 und 8 die Hälfte des Mediums durch frisches ersetzt und erneut GM-CSF zugegeben wurde.

3.2.1.5. Kultivierung von Milzzellen

Milzzellen wurden wie unter 3.5.8. beschrieben isoliert und anschließend für diverse Stimulationen in definierten Zellzahlen ausgesät und meist über Nacht kultiviert.

3.2.1.6. Elektroporation von ES-Zellen

Die ES-Zellen wurden zunächst auf drei 15 cm-Zellkultur-Schalen expandiert. Nach Ablösen der Zellen wurden diese gezählt und 5×10^7 Zellen in 7 ml Medium aufgenommen. Dieses wurde 200 µg linearisiertes Plasmid in einem Volumen von 1 ml PBS zugegeben und der Ansatz vermischt. 800 µl des Ansatzes wurden jeweils in eine Elektroporationsküvette überführt und bei 340 V und 250 µF elektroporiert. Die Zeitkonstante (τ) lag in einem Bereich von 3-4. Die Elektroporationsküvetten wurden sofort nach der Elektroporation für 10 min auf Eis gestellt. Nach Abkühlung wurden jeweils 400 µl des Ansatzes auf eine vorbereitete EF-Kultur in 10 cm-Zellkultur-Schalen ausgesät.

3.2.2. Selektion rekombinanter ES-Zell-Klone

Nach der Transfektion wurden die ES-Zellen 2 Tage ohne Selektionsdruck kultiviert, ab Tag 2 der Antibiotika-Selektion mit 200 µg/ml G418 und zusätzlich der Selektion durch 2 mg/ml Ganciclovir unterworfen. Alle 2 Tage wurde das Medium gewechselt. Sobald ES-Zellkolonien nach 10-14 Tagen herangewachsen waren, wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit diesem überschichtet und unter einem Binokular steril mit einer Mikropipette von der Platte gepickt. Die Kolonien wurden zunächst in 96 well Mikrotiterplatten mit Trypsin/EDTA vereinzelt und anschließend wieder mit EF-Zellen kokultiviert. Nach 2 Tagen wurden die ES-Kolonien auf drei Mikrotiterplatten verteilt, wobei 2 für die PCR-Untersuchung der Kolonien nach vier Tagen mit PBS gewaschen wurden und das Pellet bei -20°C eingefroren wurde. Die Klone der verbleibenden Platte

Material und Methoden

wurden währenddessen auf eine 48 well Mikrotiterplatte transferiert und nach weiteren drei Tagen Kultur bis zum Vorliegen des Ergebnisses der PCR-Untersuchung in Einfriermedium eingefroren.

3.2.3. Einfrieren von ES-Zellen

Das Einfrieren von ES-Zellen erfolgte entweder direkt in 48 well Platten oder von 6 cm bzw. 10 cm Zellkultur-Schalen. Dazu wurden die Zellen zunächst durch Trypsin/EDTA-Behandlung vereinzelt. Die Zellsuspension in 48 well Platten wurde 1:1 mit dem Einfriermedium (ES-Zellmedium incl. 25% FCS und 10% DMSO) vermischt während die Zellen von den Zellkultur-Schalen geerntet, abzentrifugiert und in Einfriermedium aufgenommen und auf Kryoröhrchen verteilt wurden. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei -20°C und dann 48 h bei -80°C gelagert bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

3.2.4. *In vitro* Cre-Rekombination

Durch Expression der Cre-Rekombinase in ES-Zellen sollte die Cre-Rekombination an den loxP-Stellen des durch Homologe Rekombination eingebrachten MyD88^{stp}-Allels induziert werden. Hierfür wurden die positiven ES-Zell-Klone mit einem Cre-exprimierenden Plasmid (pICre) elektroporiert. Die ES-Zell-Klone wurden auf eine 15 cm Zellkultur-Schale expandiert und am Tag der Elektroporation geerntet. 5×10^6 Zellen wurden in 770 μ l ES-Medium aufgenommen und dem Gemisch 30 μ l des Cre-Plasmides zugegeben. Aufgrund hoher Effizienz der Cre-Rekombinase wurde das Cre-Plasmid titriert (100 pg bis 5 μ g Plasmid pro Elektroporationsansatz). Das DNA-Zell-Gemisch wurde in Elektroporationsküvetten überführt und nach 5 minütiger Inkubation auf Eis bei 300 V und 250 μ F elektroporiert. Die Zeitkonstante (τ) lag hierbei bei 6. Sofort nach der Elektroporation wurden die Küvetten 10 min auf Eis inkubiert und die Ansätze anschließend auf vorbereitete EF-beschichtete Zellkulturschalen ausgesät. 48 h nach Elektroporation wurden die Zellen der einzelnen Ansätze geerntet und in den Verdünnungen 1:1000, 1:5000, 1:10000 und 1:50000 auf mit EF beschichtete 10 cm Zellkultur-Schalen ausgesät, da die ES-Zellen in diesem Fall nicht selektiert werden können. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Nach 10-14 Tagen konnten einzelne Kolonien wie unter 3.2.2. beschrieben gepickt und expandiert werden.

3.3. Biochemische Methoden

3.3.1. Herstellung des LIF-Überstandes

Der LIF-haltige Überstand wurde anhand des CHO-LIF-D-Zell-Klones produziert. Hierfür musste FCS, das dem CHO-Medium zugegeben wurde zunächst über 24 h gegen 2 l PBS dialysiert werden. Mit 2 l frischem PBS wurde weitere 24 h dialysiert bevor das FCS dem Zellkulturmedium zugesetzt werden konnte.

Die CHO-Zellen wurden nach dem Auftauen auf eine 10 cm Schale ausgesät und anschließend auf neun 10 cm Schalen expandiert. Nun wurde dem Medium Methothrexat (2 μ M) zugegeben und die Zellen 7 Tage kultiviert, wobei jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel erfolgte. Die Zellen wurden dann mit einer Zellzahl von 1×10^7 Zellen pro 15 cm Schale ausgesät und mit normalem Medium für 24 h kultiviert. Am nächsten Tag wurde der LIF-Überstand geerntet, sterilfiltriert und an ES-Zellen getestet um die entsprechend benötigte LIF-Konzentration zu bestimmen.

3.3.2. Herstellung von Zelllysaten

Die Zellyse erfolgte mit RIPA-Lysepuffer, dem sowohl Proteaseinhibitoren (Complete Mini Protease inhibitor cocktail, 10 mM PMSF) als auch Phosphataseinhibitoren (10 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4) zugefügt wurden, um Proteinabbau sowie Phosphatbspaltung zu verhindern. 5×10^6 Zellen wurden jeweils in einem Volumen von 50 μ l 30 min auf Eis lysiert. Um Zellmembranen, Zytoskelettbestandteile und Nuklei zu entfernen wurde 10 min bei 14 000 UpM und 4°C zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand mit 2x SDS Probenpuffer versetzt. Das Lysat wurde anschließend 5 min bei 95°C inkubiert um die Proteine zu denaturieren.

3.3.3. Proteinbestimmung nach Pierce

Dieser Assay nutzt die Fähigkeit von Proteinen, Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen zu reduzieren. Cu^+ -Ionen bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, der bei einer Wellenlänge von 562 nm absorbiert. Parallel zu den Proben wurde eine BSA-Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen von 2.000; 1.000; 500; 250; 125; 62,50; 31,25 und 0 μ g/ml auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Standardmäßig erfolgte eine Doppelbestimmung aller Proben. Zu 10 μ l Probenvolumen wurden 200 μ l des Pierce-Reagenz, bestehend aus 50 Teilen Reagenz A und einem Teil Reagenz B, pipettiert und anschließend 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 562 nm.

3.3.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße. Hierbei setzt sich die Gelmatrix aus zwei unterschiedlichen Geltypen zusammen. Zum einen aus einem großporigen Sammelgel, in welchem die Proteinproben aufgetragen und gesammelt werden, und zum anderen aus einem engporigen Trenngel, das die Proteine aufgrund seines Molekülsiebeffektes nach ihrer Größe auftrennt.

SDS, das im Probenpuffer enthalten ist, denaturiert die Proteine und bildet mit ihnen negativ geladene Komplexe, deren Ladungs- zu Masse-Verhältnis konstant ist. Während der Elektrophorese wandern diese SDS-Proteinkomplexe aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zum Pluspol. Um die Molekülgröße bestimmen zu können, wird parallel zu den Proben ein Molekulargewichtsstandard bestehend aus Referenzproteinen bekannten Molekulargewichts, aufgetragen.

Die Polyacrylamidgele hatten eine Größe von 18 cm x 6 cm und wurden mit Hilfe der Gelapparatur von Fisher Scientific gegossen. Hierbei wurde zunächst ein 10%-iges Trenngel (1,8 ml ddH₂O, 2,0 ml Acrylamid, 390 mM Tris pH 8,8, 2,5 µl TEMED und 50 µl APS) gegossen und mit Butanol beschichtet, um eine glatte Übergangsfläche zum Sammelgel zu schaffen. Nachdem dieses polymerisiert war, wurden die Reste des Butanols entfernt, das 4%-ige Sammelgel (2,1 ml ddH₂O, 0,4 ml Acrylamid, 121 mM Tris pH 6,8, 5 µl TEMED und 50 µl APS) gegossen und der Kamm für die Geltaschen aufgesetzt. War dieses polymerisiert, wurde das Gel in die Laufkammer eingespannt und mit Laufpuffer überschichtet. Die Proteinproben wurden vor Gelauftrag mit 2x Probenpuffer vermischt und 5 min bei 95°C denaturiert (Die Hitze sowie das SDS denaturieren hierbei die Proteine). Anschließend wurden die Proben aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein PreStained Marker (MagicMark, Invitrogen) verwendet. Nach Probenauftrag wurde zunächst eine Spannung von 80 V angelegt, bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte. Dann wurde die Spannung auf 100-120 V erhöht.

Für eine anschließende Färbung der Gele wurde Coomassie verwendet. Hierzu wurden die Gele zunächst 5 min in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt und dann kurz mit heißem Wasser gespült. Es folgte eine 20 minütige Entfärbung in der Entfärbelösung. Auch hier wurde unter Schwenken inkubiert. Zur Archivierung wurden die Gele mit Hilfe des Geltrockners getrocknet.

3.3.5. Western Blot

Der Western Blot ist eine immunologische Methode, bei der Proteine nach SDS-PAGE und Transfer auf eine Membran spezifisch nachgewiesen werden.

Das Gel der SDS-PAGE wurde zunächst in Transblotpuffer equilibriert. In einer „Semidry“-Blotapparatur wurden vier in Transblotpuffer getränkte Filter auf die Anode gelegt. Es folgte die ebenfalls mit Puffer befeuchtete Nitrozellulosemembran auf die nun das Gel gelegt wurde. Den Abschluss bildeten weitere vier mit Blotpuffer getränkte Filter auf die nun die Kathode gesetzt wurde. Die Proteine wurden für 45 min bei 2 mA/cm² auf die Membran transferiert und durch hydrophobe Wechselwirkungen auf dieser fixiert. Nach dem Blotten wurde die Membran standardmäßig mit einer Ponceau S-Lösung gefärbt, um die Blot-Effizienz zu testen. Um unspezifische Bindestellen abzusättigen, wurde die Membran nach einem Waschschrift mit H₂Odd 1-2 h in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST inkubiert. Über Nacht folgte die Inkubation mit dem primären AK bei 4°C auf dem Taumelschüttler. Je nach Antikörper wurde dieser in 5% (w/v) BSA oder Magermilchpulver in TBST verdünnt. Die Verdünnungen der Antikörper erfolgten jeweils nach Angaben des Herstellers. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal 10 min mit TBST gewaschen und anschließend mit einem an Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST für 1 h inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschriffe mit TBST. Als Substrat für die Peroxidase diente ECL. Durch die Peroxidase kommt es zur Umsetzung des Substrates Wasserstoffperoxid, wobei Sauerstoff frei wird. Hierdurch wird die Oxidation von Luminol im alkalischen Milieu katalysiert. Durch die Oxidation wird Luminol auf ein höheres Energieniveau transferiert. Beim Rückfall in den Grundzustand wird diese Energie als Chemilumineszenz frei. Zur Detektion wurde der Blot in einer 1:1 Mischung von ECL Reagenz 1 und 2 unter Schwenken für 1 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion des Chemilumineszenzsignales an der Kodak Image Station 200R.

Um eine Beladungskontrolle durchführen zu können wurde der Blot meist gestrippt und mit einem weiteren Erstantikörper rehybridisiert. Die Membran wurde hierfür zunächst 15 min mit TBST gewaschen und dann 20 min in Stripping Puffer (Chemicon) inkubiert. Hierbei wurden Antikörper sowie Chemilumineszenzlösung von der Membran entfernt. Nach dem Strippen konnte die Membran einer weiteren Detektion mit Antikörpern unterzogen werden.

3.4. Immunologische Methoden

3.4.1. Stimulation von Zellen mit TLR-Agonisten

Für die Stimulation der Zellen mit den verschiedenen TLR-Agonisten wurde der jeweilige Zelltyp (dendritische Zellen, Thioglykollat-Makrophagen bzw. Milzzellen) in einer Suspension von 10^6 Zellen pro ml ausgesät. Sollten die Zellen anschließend für RNA-Aufreinigung verwendet werden so wurden diese in einem Volumen von mindestens 2 ml auf 6 well Platten stimuliert. Für anschließende Bestimmung der Zytokinproduktion per ELISA, reichten Stimulationsansätze im 96 well Format mit einem Volumen von jeweils 200 µl per Well aus. Nach 2-4 stündiger Kultivierung der Zellen wurden diese mit LPS u.p. (10 ng/ml), Pam₃Cys (1 µg/ml) bzw. CpG 2216 (1 µM) für den jeweils gewünschten Zeitraum stimuliert. Die Stimuli wurden den Ansätzen standardmäßig in einem Volumen von 2 µl (96 well) bzw. 20 µl (6 well) zugefügt. Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen sofort auf Eis gegeben und mit eiskaltem PBS versehen. Nach ca. 5 min wurden die Zellen dann bei 4°C und 1500 UpM zentrifugiert und als Pellet bei -80°C weggefroren. Die stimulierten Zellen für anschließende RNA-Aufreinigung wurden in 350 µl RLT-Puffer (incl. 1% (v/v) β-ME) resuspendiert und ebenfalls bei -80°C gelagert.

3.4.2. Analyse von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Ein Durchflußzytometer ist ein Instrument zur qualitativen und quantitativen Untersuchung unterschiedlichster Zellpopulationen. Da es in den meisten Fällen mit einem zusätzlichen Zellseparator ausgestattet ist, wird das Durchflußzytometer im allgemeinen Sprachgebrauch auch kurz FACS (Fluorescence-activated cell sorter) genannt.

Durch eine Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Analyse) können einzelne Zellen aufgrund ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenz, die durch Bindung von Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern bewirkt wird, charakterisiert werden. Aus der Intensität der Fluoreszenz kann auf die Menge der gebundenen Fluoreszenz-markierten Antikörper geschlossen werden. So ist eine Aussage über die Expressionsdichte von markierten Oberflächenantigenen auf der Zelloberfläche möglich. Fluoreszenz-konjugierte Antikörper werden hierbei in einem Überschuß an isotonem Puffer durch eine Düse gepreßt, die einen feinen Flüssigkeitsstrahl generiert, in dem die Zellen einzeln und durch Intervalle getrennt vorliegen. Die Zellen passieren einen Laserstrahl und streuen hierbei das Laserlicht. Dabei werden die an die Zelle gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und emittieren wiederum Licht einer bestimmten Wellenlänge. Sensible sogenannte Photomultiplier detektieren sowohl die Lichtstreuung, die Aufschluss über Größe und Granularität der Zelle gibt, als auch die Fluoreszenz- Emissionen, die auf an die Zelle

Material und Methoden

gebundene Antikörper und damit auf Expression entsprechender Oberflächenmarker hinweisen.

Die Kombination von geeigneten Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die gleichzeitige Analyse mehrerer Antigene auf der Oberfläche einer Zelle. Voraussetzung sind Farbstoffe, die sich in ihren Emissionsspektren unterscheiden und deshalb getrennt voneinander gemessen werden können. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden FITC (530 nm), PE (585 nm), PerCP (682 nm) und APC (650 nm) verwendet. Die Analysen der Immunfluoreszenz erfolgte am FACScalibur Durchflußzytometer mit CellQuest-Software.

Die Färbung der Zellen erfolgte auf 96 V well Mikrotiterplatten. Circa 5×10^5 Zellen wurden in einen Färbeansatz eingesetzt. Geerntete Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und einer FC-Rezeptor-Blockade unterzogen indem sie 10 min mit $1 \mu\text{g}$ eines Antikörpers gegen murines CD16/32 in einem Volumen von $50 \mu\text{l}$ inkubiert wurden. Dieser Schritt diente der Reduktion von unspezifischen Hintergrundsignalen. Es folgte die Färbung mit den jeweiligen Antikörpern, die standardmäßig in einem Volumen von $50 \mu\text{l}$ und mit einer Konzentration von $1 \mu\text{g}$ pro Ansatz eingesetzt wurden. Die Färbung wurde 20 min bei 4°C im Dunkeln durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen entweder mit weiteren Antikörpern inkubiert oder in $400 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen und analysiert.

3.4.3. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Zum Nachweis von Zytokinen und Chemokinen in Zellkulturüberständen wurden ELISAs (Enzyme linked immunosorbent assays) durchgeführt. Es wurden ELISA-Kits der Firma R&D verwendet, die auf der Technik des Sandwich-ELISA basieren. Bei diesem Assay wird ein gereinigter polyklonaler Antikörper gegen das zu untersuchende Antigen auf eine Mikrotiterplatte gebunden. Die Probe wird dann in die wells pipettiert und inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Platte gewaschen um ungebundene Bestandteile zu entfernen. Anschließend wird ein Detektionsantikörper, der an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt und ebenfalls gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet ist, zugegeben. Nach Inkubation und weiteren Waschschritten wird das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben, das von der Peroxidase in ein gefärbtes Produkt umgewandelt wird. Die Reaktion wird durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt. Durch den niedrigen pH-Wert kommt es zum Farbumschlag von blau nach gelb (450 nm), der durch Messung der optischen Dichte bestimmt werden kann. Anhand eines mitgeführten Standards können quantitative Aussagen über den Gehalt des zu untersuchenden Antigens in der Probe gemacht werden.

3.5. Tierversuche

3.5.1. Organentnahme

Zur Entnahme von Organen oder Zellen aus Mäusen, wurden diese durch zervikale Dislokation schmerzfrei getötet und die jeweiligen Organe nach Desinfektion des Operationsgebietes mit 70% EtOH steril entnommen.

3.5.2. Superovulation

Um Embryonen im Blastozystenstadium entnehmen zu können und um die Anzahl der gebildeten Embryonen zu erhöhen, wurden weibliche C57BL/6-Mäuse superovuliert. Dazu wurde den Mäusen zwischen 14-17 Uhr 10 U PMSG und 44-48 h später 10 U HCG intraperitoneal injiziert. Anschließend wurden die Mäuse mit männlichen Artgenossen verpaart. Für die Blastozysteninjektion wurden die Embryonen am Tag 3,5 entnommen.

3.5.3. Gewinnung embryonaler Fibroblasten

Die embryonalen Fibroblasten für die Kultivierung von ES-Zellen wurden aus superovulierten CD1 Mäusen an Tag 14 post coitum gewonnen. Den Spendertieren wurde, nach Tötung durch zervikale Dislokation, der Uterus steril entnommen und in einer Petrischale mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen aus dem Uterus präpariert und in PBS gewaschen. Aus dem Korpus der Embryonen wurde nun Herz, Leber und Lunge entfernt, um einen Großteil der fibroblastischen Zellen zu entfernen. Das restliche embryonale Gewebe wurde mit einem Skalpell so fein wie möglich zerteilt, dann 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. Anschließend wurden die Zellen geerntet, auf Kryoröhrchen verteilt, für 30 min bei -20°C und anschließend 48 h bei -80°C gelagert bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

3.5.4. Blastozysteninjektion

An Tag 3,5 post coitum wurden superovulierende C57BL/6 Weibchen durch zervikale Dislokation getötet, die Uteri isoliert und die Blastozysten retrograd ausgespült. Bis zur Injektion wurden sie in M2 Medium bei 37°C und 7% CO_2 gelagert. Etwa 15-20 der homolog rekombinierten 129Sv ES-Zellen wurden unter einem Lichtmikroskop mit Hilfe

von Mikromanipulatoren in das Blastocoel injiziert. Die Blastozysteninjektion wurde in der Arbeitsgruppe von Sandra Beer an der HHU Düsseldorf durchgeführt.

3.5.5. Generierung chimärer Mäuse

Für die Generierung chimärer Mäuse aus homolog rekombinierten ES-Zellen kam die unter 3.5.4. beschriebene Blastozysteninjektion zur Anwendung. Die manipulierten Blastozysten wurden anschließend in den Uterus pseudoschwangerer Ammenmütter transferiert. Bis zu 10 Blastozysten wurden pro Uterushorn transferiert. Die Blastozysteninjektion sowie die Reimplantation wurde in der Arbeitsgruppe von Sandra Beer an der HHU Düsseldorf durchgeführt.

Die aus der Schwangerschaft der Leihmütter entstandenen Tiere wurden auf ihre Fellfarbe hin untersucht. Bei den Mäusen, die eine gelb-schwarz gemischte Fellfarbe aufwiesen handelte es sich um chimäre Mäuse, die nun in den (SPF) Bereich des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München überführt und mit C57BL/6 Mäusen weiter verpaart wurden. Mäuse der nächsten Generation wurden auf Keimbahntransmission getestet.

3.5.6. Isolierung muriner Primärzellen

3.5.7. Generierung von myeloiden DC aus dem Knochenmark

Um myeloide dendritische Zellen (DC) zu generieren wurden zunächst Knochenmarkszellen isoliert. Hierfür wurden Femur und Tibia aus C57BL/6-Mäusen entnommen und von umliegendem Muskel- und Fettgewebe befreit, in 70%igem Ethanol gereinigt und in eine 6 cm Zellkultur-Schale mit PBS gegeben. Anschließend wurden die Epiphysen von Femur und Tibia abgetrennt und die medialen Röhrenknochenstücke mit je 5 ml RPMI-Medium (mit einer 10 ml-Spritze, 27G-Kanüle) durchspült. Nach Zentrifugation der Zellsuspension bei 1500 UpM für 5 min wurden die Zellen in 10 ml RPMI-Medium resuspendiert. Nach Gewinnung des Knochenmarkszellgemisches konnten nun durch Zugabe des Wachstumsfaktors GM-CSF myeloide DC generiert werden. Die entsprechenden Progenitorzellen differenzieren unter dem Einfluss von GM-CSF zu myeloiden DC aus. 7×10^6 Zellen wurden pro ml Medium ausgesät und mit 20 $\mu\text{g/ml}$ GM-CSF für 10 Tage in Kultur genommen, wobei am Tag 3, 6 und 8 die Hälfte des Mediums durch frisches ersetzt und erneut GM-CSF zugegeben wurde. Bei der Differenzierung der Knochenmarkszellen zu dendritischen Zellen bilden sich charakteristischer Weise Cluster aus. Am Tag 10 der Kultur wurde der Überstand abgenommen und der Anteil der myeloiden DC anhand der Expression von CD11c und

Material und Methoden

CD11b im FACS bestimmt. Bei einem Anteil von mindestens 55% doppeltpositiver Zellen wurden diese in Stimulationsexperimente eingesetzt.

3.5.8. Isolierung von Milzzellen

Nach Explantation der Milz wurde diese in Medium über ein 70 µm Zellsieb homogenisiert. Um die Zellsuspension von Erythrozyten zu befreien, wurde nach dreiminütiger Zentrifugation bei 1500 UpM das Zellpellet in 3 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen und für 2 min bei 37°C inkubiert, wodurch die Erythrozyten hypotonisch lysiert wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 ml Medium gestoppt und die verbleibenden Leukozyten durch Zentrifugation und gegebenenfalls nochmaliges Sieben von Zellresten abgetrennt.

3.5.9. Thioglykollat-Injektion und Peritoneallavage

Zur Gewinnung von Peritoneal-Makrophagen wurden C57BL/6-Mäuse mit 800 µl Thioglykollat i.p. injiziert. Dadurch wird die Migration von Makrophagen in das Peritoneum induziert. Nach 4-5 Tagen erfolgte die Peritoneallavage mit 10 ml PBS. Hierfür wurde eine Spritze mit einer 19G Kanüle verwendet und die Peritonealhöhle gründlich gespült. Die so gewonnene Zellsuspension wurde anschließend bei 1500 UpM 5 min abzentrifugiert und in 1 ml Erythrozyten-Lyse aufgenommen, um Erythrozyten durch hypotone Lyse zu entfernen. Nach zweiminütiger Inkubation bei 37°C wurde erneut zentrifugiert, die Zellen einmal in PBS gewaschen und schließlich in RPMI-Medium aufgenommen. Durch FACS-Analyse wurde der Anteil an Peritoneal-Makrophagen bestimmt und die Zellen konnten in Stimulationsexperimente eingesetzt werden.

3.6. Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch den „Student's t“-Test. Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM aufgeführt. Unterschiede werden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0,05$ ist, d. h. wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Aussage unter 5% liegt.

4. Ergebnisse

4.1. Teil 1: Generierung eines MyD88^{stp/stp} Mausstammes durch „switch on“-Mutagenese

Um Einblicke in die unterschiedlichen Funktionen von MyD88 in der angeborenen Immunantwort zu erhalten, ist eine gezielte Expression dieses Proteins in definierten Zelltypen erforderlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *in vivo* Modell etabliert, das die Expression von MyD88 in einzelnen Zellpopulationen ermöglicht.

Das konditionale System der „switch-on“-Mutagenese („switch-on“ = Anschalten eines Gens) dient hierbei als strategische Grundlage des Modells. Durch homologe Rekombination von pluripotenten embryonalen Stammzellen wurde ein Mausstamm generiert, der eine Stopp-Kassette mit flankierenden *loxP*-Sequenzen im MyD88 Genlokus enthält. Dieser als MyD88^{stp/stp} bezeichnete Mausstamm kann in weiterführenden Arbeiten mit Mauslinien gekreuzt werden, die unter der Kontrolle von zelltyp-spezifischen Promotoren die Cre-Rekombinase exprimieren. Dadurch wird im entsprechenden Zelltyp die Stopp-Kassette aus dem Genlokus entfernt und MyD88 reexprimiert. Es kommt zu einem Funktionsgewinn durch MyD88 in der entsprechenden Zellpopulation, während die restlichen Gewebe MyD88-defizient bleiben.

4.1.1. Klonierung des Targetvektors

Als Grundlage für die Klonierung des Rekombinationsvektors diente der pBSlacZTK-Vektor (Abb. 6), ein pBluescript-Derivat, das von Sandra Beer (HHU Düsseldorf) kloniert und uns zur Verfügung gestellt wurde.

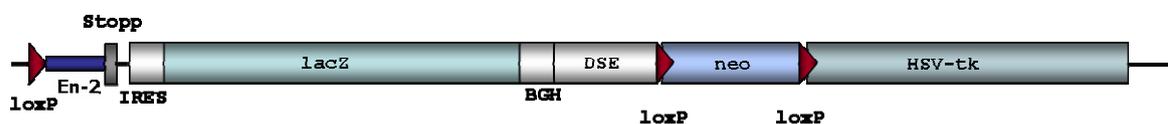


Abb. 6: Schematische Darstellung des pBSlacZTK-Inserts. Der Vektor enthält eine geflochte Stopp-Kassette, ein Reportergen für die β -Galaktosidase (*lacZ*) sowie die Selektionsmarker *neo* (neomycin) und HSV-tk (herpes simplex virus-thymidin kinase). En-2 (engrailed-2), IRES (internal ribosome entry site), BGH (bovine growth hormone) und DSE (downstream sequence element)

Ergebnisse

Der Vektor verfügt bereits über eine Stopp-Kassette mit flankierenden *loxP*-Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase sowie ein Reportergen (*lacZ*).

Um eine korrekte Rekombination des Vektors mit dem endogenen *MyD88*-Lokus zu ermöglichen, wurde die Stopp-Kassette an beiden Seiten von unterschiedlich langen homologen Bereichen flankiert, die als „kurzer-“ bzw. „langer Arm“ bezeichnet werden. Durch die Insertion einer RNA II-Pause-Stelle (DSE-Element) in das pBluescript-Derivat soll eine Umspleissung der Stopp-Kassette verhindert werden. Als Spleiss-Akzeptor-Stelle fungiert die En-2-Sequenz (engrailed-2 sequence), welche in 5'-Richtung der Stopp-Kassette positioniert wurde, wodurch gewährleistet wird, dass nach erfolgtem Spleissvorgang die Stopp-Kassette direkt an die Exon1-Sequenz von *MyD88* anschließt. Des Weiteren enthält der Vektor das Gen für Neomycinresistenz als positiven Selektionsmarker sowie für eine negative Selektion das Gen der Thymidinkinase (*tk*) des Herpes-Simplex-Virus (HSV). Die homologe Rekombination tritt bei Säugetierzellen sehr selten auf, so dass ein wirksames Selektionsverfahren notwendig ist, um rekombinante Zellen zu identifizieren. Durch Neomycin-Exposition der Zellen nach erfolgter Elektroporation können ES-Zellen identifiziert werden, die das entsprechende Resistenzgen enthalten. Die Neomycinphosphotransferase erlaubt das Wachstum von rekombinierten ES-Zell-Klonen in Gegenwart des Antibiotikums Geneticin (G418). Da die HSV-*tk*-Kassette außerhalb des homologen Bereichs liegt, wird diese nach erfolgreicher homologer Rekombination nicht stabil in das Wirtsgenom integriert. Infolgedessen kann durch gleichzeitige Behandlung mit dem Virostatikum Ganciclovir negativ selektiert werden. Durch Ganciclovir-Gabe wird von der viralen Thymidinkinase ein Monophosphat gebildet, welches durch zelleigene Kinasen phosphoryliert wird und als Nukleosidanalogen in die DNA inkorporieren kann. Die Replikation der Zellen wird dadurch gehemmt. Wird durch Einbau des gewünschten Inserts das HSV-*tk* Leseraster zerstört, überleben die Zellen die Behandlung mit Ganciclovir. Damit ist sichergestellt, dass der Einbau an einer definierten Stelle stattgefunden hat.

Für die Generierung des Targetkonstrukts wurde zunächst per PCR ein 654 bp langes homologes Fragment des ersten Introns des *MyD88*-Gens amplifiziert („kurzer Arm“). Als „Template“ diente genomische DNA von E14.1-Zellen. Nach Subklonierung des Amplifikates in den Topovektor wurde dieses über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *SalI* vor die erste *loxP*-Erkennungssequenz in das oben erwähnte pBluescript-Derivat kloniert. Der „lange Arm“, der eine Sequenz von 2498 bp umfasst, wurde ebenfalls per PCR amplifiziert. Hierfür waren aufgrund der Fragmentgröße zwei Reaktionen notwendig. Die beiden Fragmente wurden jeweils in den Topovektor subkloniert und anschließend durch einen weiteren Klonierungsschritt unter Verwendung der endogenen Schnittstelle *StuI* zu einem Fragment zusammengefügt. In einem letzten Schritt wurde der „lange Arm“ über die Schnittstelle *AscI* 3' der dritten *loxP*-Erkennungssequenz in den Rekombinationsvektor kloniert. Die korrekte Orientierung konnte durch eine

Ergebnisse

Sequenzierungsreaktion bestätigt werden. Zur Kontrolle wurden sämtliche PCR-Amplifikate sowie Produkte der einzelnen Subklonierungen sequenziert. In Abb. 7 ist die Strategie zur Generierung des MyD88^{stp}-Allels schematisch dargestellt.

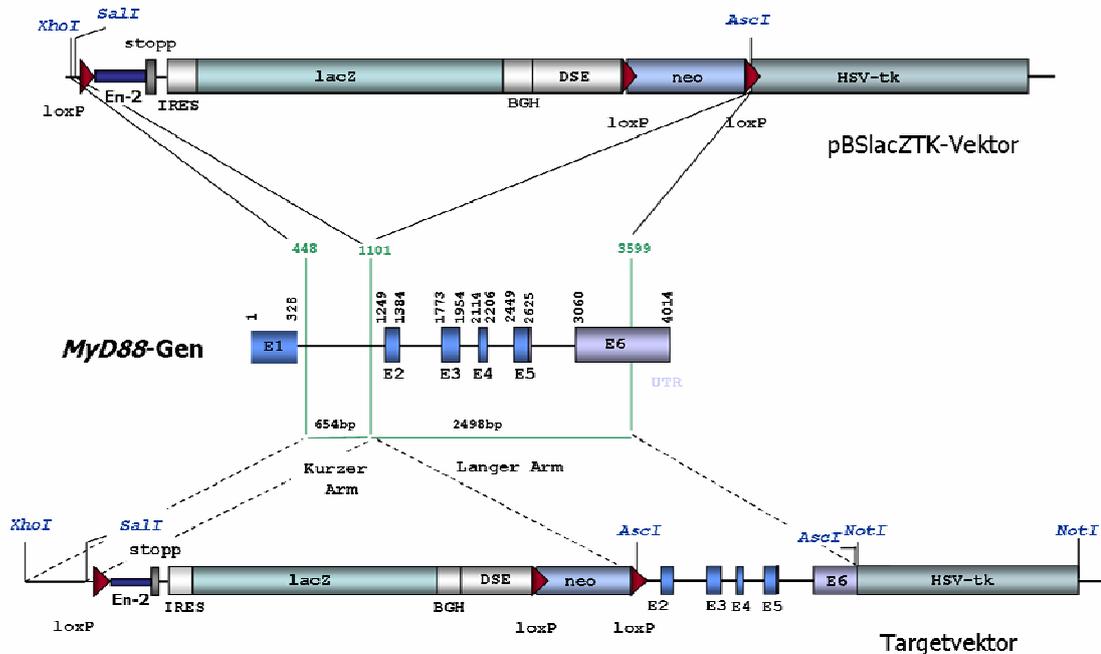


Abb. 7: Targetingstrategie für die Generierung des MyD88^{stp}-Allels. Als Ausgangsvektor diente pBlacZTK. Über die Restriktionsstellen *XhoI* und *SalI* wurde ein „kurzer Arm“ des *MyD88*-Gens in pBlacZTK kloniert. Über *AscI* erfolgte die Insertion des „langen Armes“. Unten dargestellt ist der Targetvektor mit integrierter gefloxter Stopp-Kassette im *MyD88*-Gen. E (Exon), En-2 (engrailed-2), IRES (internal ribosome entry site), BGH (bovine growth hormone), lacZ (Reportergen für β -Galaktosidase), DSE (downstream sequence element), neo (neomycin) und HSV-tk (herpes simplex virus- thymidin kinase)

4.1.2. Erzeugung von MyD88^{stp/+} ES-Zellen durch homologe Rekombination

Für die Erzeugung von mutierten MyD88^{stp/+} embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) musste der Rekombinationsvektor zunächst mit dem Restriktionsenzym *XhoI* linearisiert werden. ES-Zellen (E14.1 vom Stamm 129Sv) wurden anschließend mit dem linearisierten Rekombinationsvektor elektroporiert und auf embryonalen Fibroblasten (EF-Zellen) kultiviert. Ab Tag 2 wurden die Zellen in Anwesenheit von Geneticin und Ganciclovir kultiviert. An Tag 12 nach Beginn der Antibiotikum- bzw. Virostatikum-Selektion wurden 556 Klone gepickt, auf 96 well Platten überführt und expandiert. Bei Konfluenz der Platten wurden diese auf drei 96 well Platten gesplittet und erneut expandiert.

Ergebnisse

Anschließend wurden Klone einer der 96 well Platten jeweils auf eine 48 well Platte überführt, eine weitere 96 well Platte bei -20°C als Backup gelagert und die dritte Platte für eine „Screening-PCR“ verwendet.

Hierbei wurden die Zellen auf eine Thermowell PCR-Platte überführt, auf dieser lysiert und anschließend in eine PCR-Reaktion, die den Vektor-Genom-Übergang amplifiziert (Abb. 9), eingesetzt. Der erste Primer bindet dabei 3' des Rekombinationsvektors in Exon 1 des endogenen *MyD88*-Gens, der zweite Primer 3' der ersten *loxP*-Erkennungsstelle im Targetvektor. Auf diese Weise wird der „kurze Arm“ inklusive des Genom-Überganges amplifiziert. Dadurch konnte nur bei erfolgreicher homologer Rekombination ein Amplifikat (824 bp) entstehen.

Um auch schwache Signale detektieren zu können, wurde das Agarosegel auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer radioaktiv markierten Sonde, die 354 bp des „kurzen Armes“ umfasst, hybridisiert. Dabei zeigten 5 ES-Zell-Klone ein positives Signal (Abb. 8). Diese wurden auf der 48 well Platte identifiziert und solange expandiert, bis Aliquots eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert werden konnten. Der endgültige Nachweis positiver Klone erfolgte im Anschluß daran durch Southern Blot Analyse.

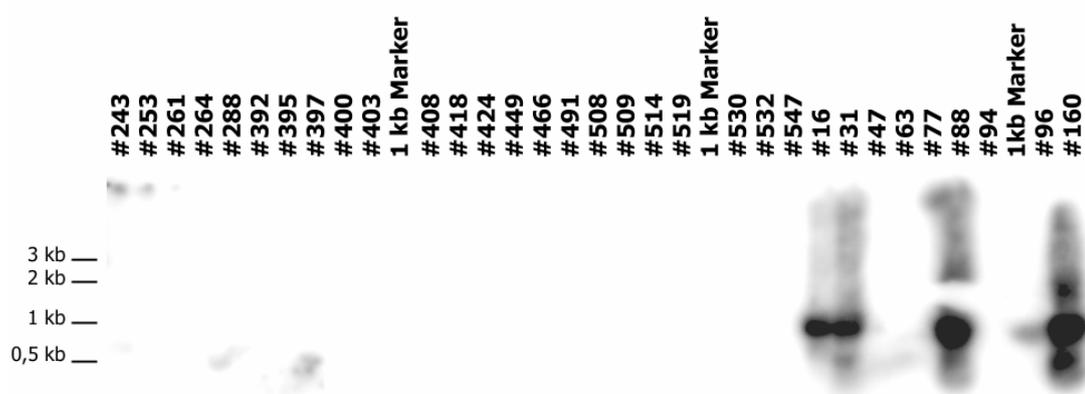


Abb. 8: Hybridisierung der Screening-PCR. Nach PCR-Amplifizierung und Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel wurde dieses auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer Sonde für den „kurzen Arm“ hybridisiert. Lediglich bei korrekter homologer Rekombination des Vektors mit dem Genom wird ein Amplifikat der Länge von 824 bp erwartet.

Ergebnisse

4.1.3. Southern Blot Analyse der homolog rekombinierten ES-Zellen

Die PCR-positiven ES-Zell-Klone wurden nun durch Southern Blot Analyse überprüft. Um die Verunreinigung durch Wildtyp-DNA möglichst gering zu halten, erfolgte die Anzucht der zu testenden Klone ohne embryonale Fibroblasten. Die isolierte genomische DNA wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym *XbaI* verdaut, nach einer Agarosegel-Trennung auf eine Nylonmembran geblottet und anschließend mit einer 3'-flankierenden Sonde, die außerhalb des Targetvektors bindet, hybridisiert.

Wie aus Abb. 9 entnommen werden kann, ist für das Wildtyp-Allel eine Bande bei 3,3 kb und für das mutierte Allel eine Bande bei 11,8 kb zu erwarten.

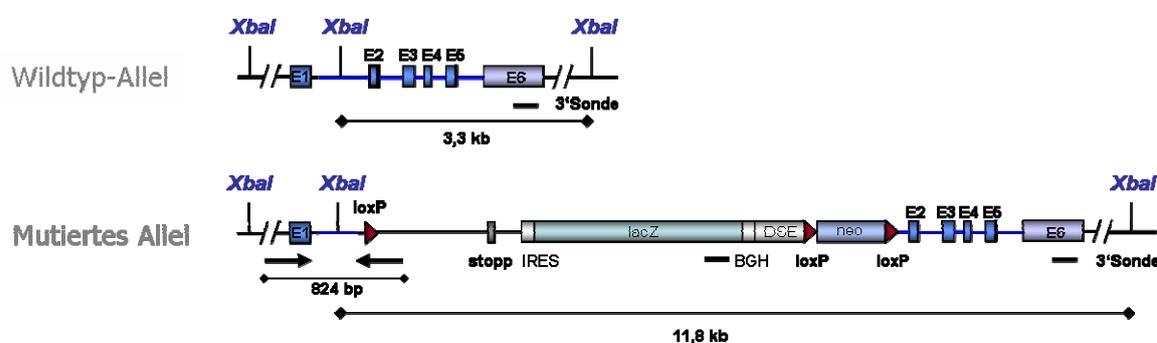


Abb. 9: Strategie für die Southern Blot Analyse. Der Verdau genomischer DNA mit dem Restriktionsenzym *XbaI* führt nach Hybridisierung mit der 3'-Sonde im Exon6 zu einem 3,3 kb Fragment im Wildtyp-Allel und einem 11,8 kb Fragment im mutierten Allel. Die Pfeile markieren das Amplifikat der Screening-PCR.

E (Exon), IRES (internal ribosome entry site), BGH (bovine growth hormone), lacZ (Reportergen für β -Galaktosidase), DSE (downstream sequence element) und neo (neomycin).

Drei der fünf PCR-positiven aus insgesamt 556 analysierten Klonen zeigten die erwarteten Hybridisierungssignale für das Wildtyp- und das mutierte Allel (Abb. 10A). Um multiple zufällige Integrationen des Targetvektors ins Genom ausschließen zu können, wurde eine Southern Blot Analyse mit einer lacZ-spezifischen Sonde durchgeführt (Abb. 10B). Da diese Sonde im Vektor bindet, können so sämtliche Integrationen des Vektors ins Genom detektiert werden. Genomische DNA der drei erfolgreich rekombinierten ES-Zell-Klone wurde erneut mit dem Restriktionsenzym *XbaI* verdaut und mit der lacZ-Sonde hybridisiert. Bei zusätzlichen Integrationen würden neben der Bande bei 11,8 kb weitere Hybridisierungssignale sichtbar.

Ergebnisse

Wie aus Abb. 10 ersichtlich, zeigten alle drei untersuchten ES-Zell-Klone lediglich ein Signal mit einer Bandengröße von 11,8 kb, wodurch zusätzliche unerwünschte Integrationen ausgeschlossen werden können.

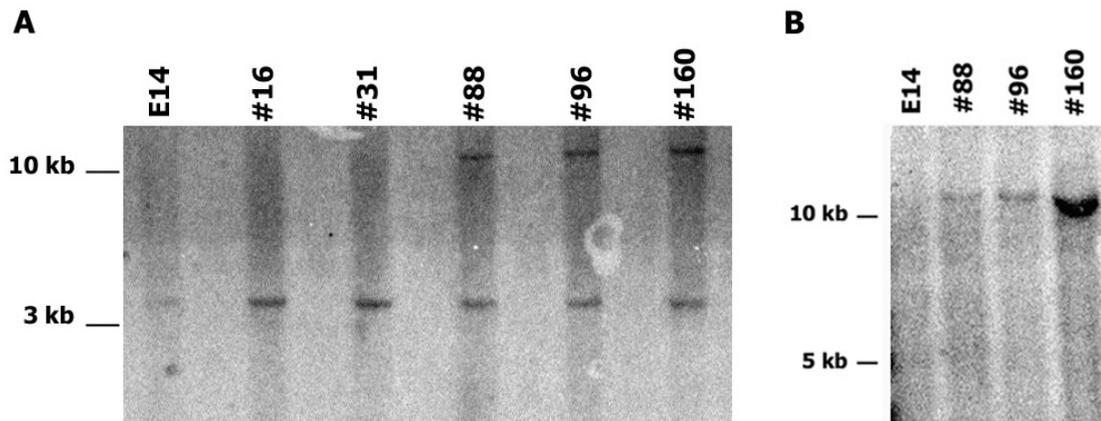


Abb. 10: Southern Blot Analyse homolog rekombinierter ES-Zell-Klone. In **A** ist das Ergebnis der Hybridisierung PCR-positiver ES-Zell-Klone mit der 3' Sonde dargestellt. Eine Bande bei 3,3 kb repräsentiert das Wildtyp- und eine Bande bei 11,8 kb das mutierte Allel. **B** zeigt das Ergebnis der Hybridisierung der drei korrekt im Genom integrierten Klone mit der lacZ-Sonde (Nachweis möglicher Zusatzintegrationen). Bei Einfachintegration ist eine Bande bei 11,8 kb zu erwarten.

4.1.4. *In vitro* Cre-Rekombination

Durch *in vitro* Cre-Rekombination sollte im Folgenden die Neomycin-Resistenz-Kassette aus dem *MyD88*-Lokus der homolog rekombinierten ES-Zell-Klone entfernt werden (Abb. 11), um die Zahl der *loxP*-Erkennungssequenzen im Genom von 3 auf 2 zu reduzieren. Dies wurde angestrebt, da 3 verbleibende *loxP*-Sequenzen bei anschließender *in vivo* Cre-Rekombination zu drei verschiedenen Rekombinationsereignissen führen könnten.

Ergebnisse

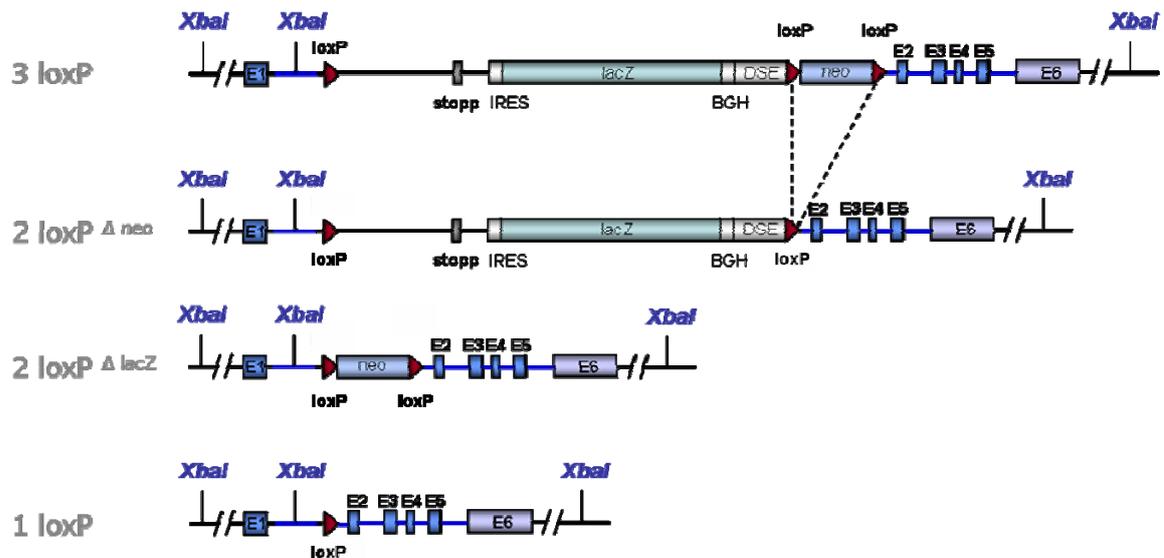


Abb. 11: Strategie für die *in vitro* Cre-Rekombination. Durch Cre-vermittelte Rekombination in ES-Zell-Klonen können aufgrund der 3 vorhandenen *loxP*-Sequenzen verschiedene rekombinierte Allele entstehen. Durch Rekombination der beiden äußeren *loxP*-Erkennungssequenzen entsteht ein 1*loxP*-Allel. Eine Rekombination der neo-flankierenden *loxP*-Stellen führt zum 2*loxP* Δ neo-Allel. Ebenfalls ein 2*loxP*-Allel resultiert nach Rekombination der die Stopp-Kassette flankierenden *loxP*-Stellen, das 2*loxP* Δ lacZ-Allel.

E (Exon), IRES (internal ribosome entry site), BGH (bovine growth hormone), lacZ (Reportergen für β -Galaktosidase), DSE (downstream sequence element) und neo (neomycin).

Zwei der drei homolog rekombinierten ES-Zell-Klone (#88 und #160) wurden mit dem Cre-kodierenden Plasmid pICre elektroporiert. Durch limitierende Verdünnungen wurden einzelne Klone angezogen und jeweils die Hälfte der Zellen dieser Zell-Klone einer G418 Selektion ausgesetzt. ES-Zell-Klone, die durch Cre vermittelte Rekombination, ihre Neomycin-Resistenz-Kassette verloren haben (2*loxP* Δ neo), sollten gegenüber G418 keine Resistenz mehr aufweisen. Aufgrund der hohen Ausbeute an G418 sensitiven Klone konnte auf eine hohe Effizienz des Cre-Enzyms geschlossen werden. Daraus könnte eine vollständige Rekombination (1*loxP*) resultieren, wodurch die Stopp-Kassette aus dem Locus entfernt würde. Das Cre-Plasmid wurde deshalb in einem Bereich von 5 μ g bis 100 pg Plasmid-DNA pro Elektroporationsansatz titriert um das Ereignis der Rekombination zwischen den, die neo-Kassette flankierenden *loxP*-Stellen, zu erhöhen. G418-sensitive Klone wurden anschließend weiter kultiviert und per Southern Blot Analyse getestet.

Ergebnisse

4.1.5. Analyse der Cre-rekombinierten ES-Zellen im Southern Blot

Die isolierte DNA der G418-sensitiven, Cre-behandelten ES-Zell-Klone wurde mit dem Restriktionsenzym *XbaI* verdaut und nach Auftrennung im Agarosegel auf eine Nylonmembran geblottet. Diese wurde anschließend mit einer neo-spezifischen Sonde hybridisiert. Wie Abb. 12A zeigt, kam es bei den Klonen #5EP2, #81EP2, #19EP2, #86EP2 #57RP2 und #90EP2 zu einer Deletion der neo-Kassette, da sie im Southern Blot kein Hybridisierungssignal aufweisen. Um einen zusätzlichen Verlust der Stopp-Kassette in diesen ES-Zell-Klonen ausschließen zu können, wurde die DNA nach Strippen nochmals mit der unter 4.1.3. beschriebenen 3' flankierenden Sonde hybridisiert (Abb. 12B).

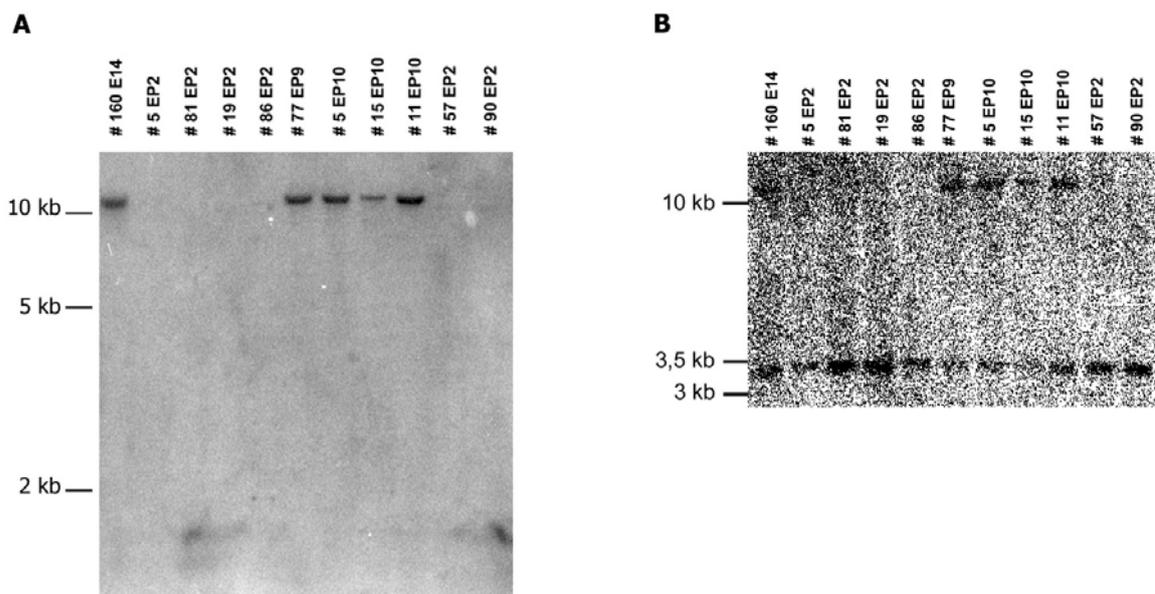


Abb. 12: Southern Blot Analyse der Cre-rekombinierten ES-Zell-Klone. Mit dem Cre-Plasmid elektroporierte ES-Zell-Klone sind in **A** hybridisiert mit einer neo-spezifischen Sonde und in **B** hybridisiert mit einer 3'-flankierenden Sonde dargestellt. Ebenfalls gezeigt ist der homolog rekombinierte Ausgangs-ES-Zell-Klon, #160E14, der das 3loxP-Allel besitzt. Eine Bande bei 11,8 kb ist in **A** nur dann zu erwarten, wenn keine Rekombination stattgefunden hat, so dass das 3loxP-Allel in diesen Klonen enthalten ist. Die in **B** gezeigten Banden bei 3,3 kb repräsentieren das Wildtyp- sowie das vollständig rekombinierte 1loxP-Allel.

Ergebnisse

ES-Zell-Klone, bei denen die neo-Kassette deletiert wurde, wiesen zusätzlich eine Deletion der Stopp-Kassette auf, da diese Klone bei der Hybridisierung mit der im Exon6 bindenden 3'-Sonde ein Signal bei einer Größe von ca. 3 kb aufzeigen, das dem für das Wildtyp-Allel erwarteten Signal entspricht.

Da bereits bei sehr geringen Mengen des Cre-Plasmides eine vollständige Rekombination erfolgte, kann davon ausgegangen werden, dass bei *in vivo* vermittelter Cre-Rekombination ein ähnliches Rekombinationsmuster zu erwarten ist. Hier ist jedoch zu beachten, dass sich die Zugänglichkeit des *MyD88*-Genlokus für die Cre-Rekombination in ES-Zellen unter Umständen von der Situation in adulten somatischen Zellen unterscheiden könnte.

4.1.6. Generierung eines *MyD88*^{Stp/Stp} Mausstammes aus rekombinanten ES-Zellen

Um einen *MyD88*^{stp/stp} Mausstamm zu generieren, wurden ES-Zellen von 2 der 3 homolog rekombinierten ES-Zell-Klone, #88 und #160, in 2,5 Tage alte Blastocysten von C57BL/6 Spendertieren injiziert (Abb. 13). Die verwendeten ES-Zellen sind heterozygot (m/M) für die spezifische Mutation und homozygot (A/A) für die Fellfarbe agouti. Anschließend wurden die manipulierten Blastozysten in die Uteri von pseudoschwangeren Weibchen transferiert. Auf diese Weise entstehen aus den implantierten Blastozysten chimäre Mäuse. Der Grad des Chimärismus spiegelt hierbei den Anteil der homolog rekombinierten ES-Zellen am Gesamtorganismus wieder.

Ergebnisse

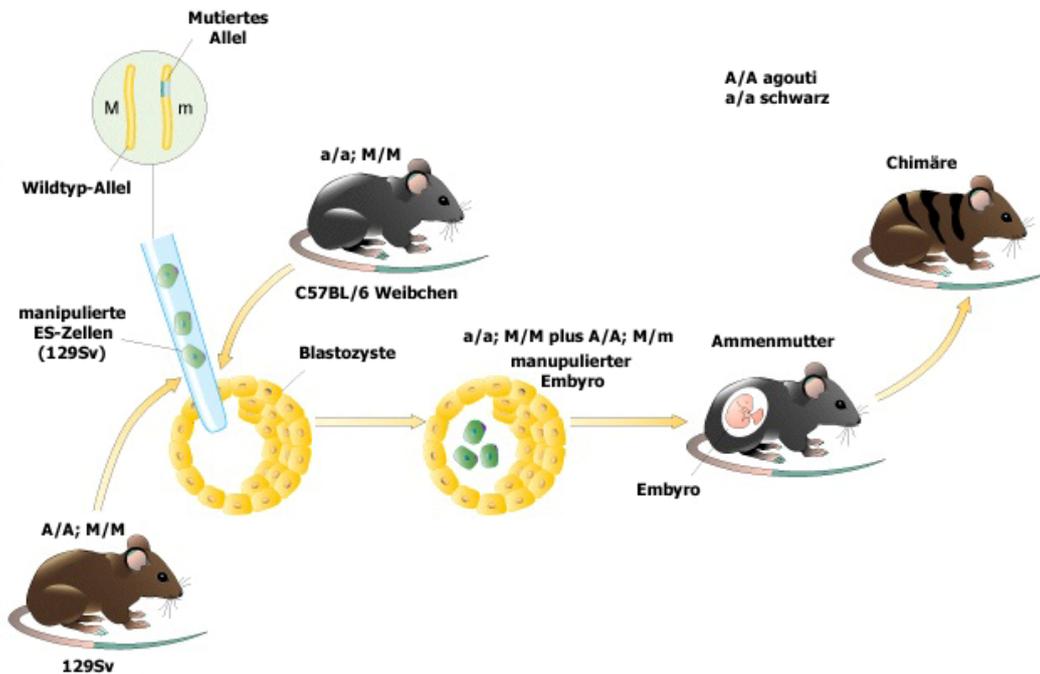


Abb. 13: Schematische Darstellung der Generierung chimärer Mäuse aus homolog rekombinierten ES-Zellen durch Blastozysteninjektion. Manipulierte ES-Zellen werden in 2,5 Tage alte Blastozysten injiziert. Diese werden anschließend in die Uteri pseudoschwangerer Weibchen implantiert. Der Anteil der mutierten ES-Zellen am Gesamtorganismus kann anhand der Fellfarbe abgeschätzt werden.

Hochchimäre Mäuse, deren Fellfarbe überwiegend dem Typ agouti entsprach, wurden anschliessend mit C57BL/6 Mäusen verpaart (Abb. 14). Die Wahrscheinlichkeit, dass das mutierte Allel an die Nachkommen weitergegeben wird, liegt bei 50%. Lediglich Nachkommen der Chimäre, die aus dem ES-Zell-Klon #88 resultierten, zeigten agoutifarbenes Fell. Diese wurden im Folgenden auf Keimbahntransmission des MyD88^{stp}-Allels getestet.

Ergebnisse

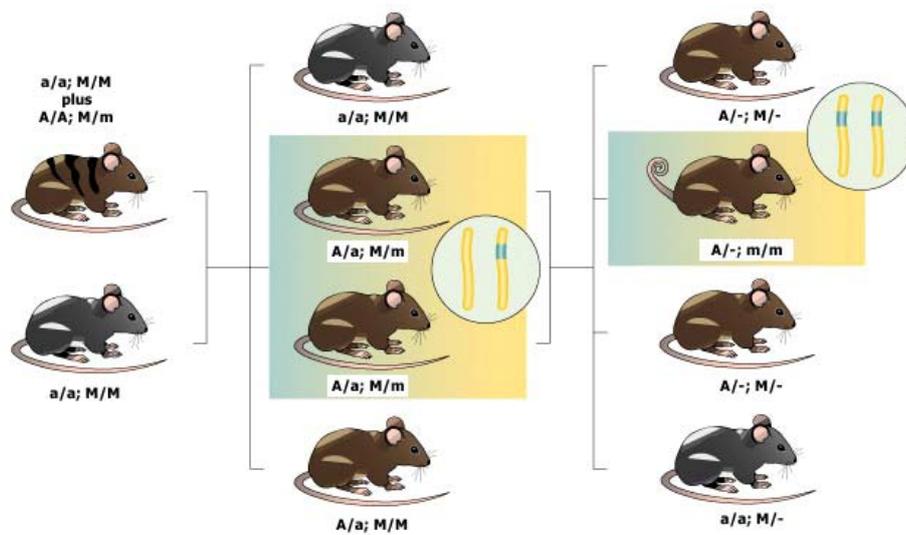


Abb. 14: Verpaarungsschema. Die Verpaarung der chimären Mäuse mit C57BL/6 Mäusen gibt Aufschluss über eine mögliche Keimbahntransmission des mutierten Allels. Da das agouti-Allel der 129Sv ES-Zellen gegenüber dem Allel für die schwarze Fellfarbe der C57BL/6 Mäuse dominant ist, können über die braune Fellfarbe heterozygote Tiere identifiziert werden.

Zu diesem Zweck wurde aus Schwanz-Biopsien der agoutifarbenen Nachkommen DNA isoliert und das Vorhandensein des mutierten MyD88-Alleles zunächst mittels Genotypisierungs-PCR überprüft. Heterozygote Mäuse wurden anschließend untereinander verpaart, um in der F2-Generation homozygote Nachkommen zu erhalten. Die Genotypisierung der F2-Generation erfolgte dann mittels Southern Blot Analyse. Isolierte DNA aus Schwanz-Biopsien wurde dazu mit dem Restriktionsenzym *XbaI* verdaut, und wie bereits unter 4.1.3. beschrieben, nach anschließender Agarosegel-Trennung auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit der 3'-flankierenden Sonde. Wie bereits für positive ES-Zell-Klone beschrieben, ist für das Wildtyp-Allel eine Bande bei 3,3 kb und für das mutierte Allel eine Bande bei 11,8 kb zu erwarten (Abb. 9). In Abb. 15 sind exemplarisch die drei erhaltenen Genotypen dargestellt.

Ergebnisse

MyD88^{stp/stp} Mäuse wurden mit der erwarteten Mendelschen Frequenz geboren und waren fertil. Die folgenden Experimente wurden mit homozygoten Tieren aus der F2-Generation und entsprechenden Kontrolltieren (sog. Littermates) aus demselben Wurf durchgeführt.

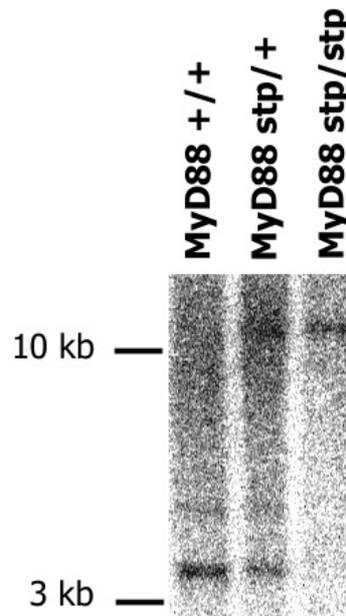


Abb. 15: Southern Blot Analyse der Schwanz-DNA der generierten Mäuse. Hybridisierung mit der 3'-flankierenden Sonde zeigt das für das Wildtyp-Allel erwartete 3,3 kb große Fragment in Wildtyp- sowie heterozygoter Schwanz-DNA. Das mutierte Allel wird durch ein 11,8 kb großes Fragment repräsentiert und ist in der DNA aus Schwanz-Biopsien homozygoter sowie heterozygoter Mäuse zu detektieren.

4.1.7. Nachweis der Funktionalität der integrierten Stopp-Kassette

Nachdem der genotypische Nachweis der Integration des modifizierten *MyD88*-Gens in den genomischen Locus mittels Southern Blot Analyse erbracht wurde, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die eingeführte Stopp-Kassette im *MyD88*-Genlocus funktionell ist. Durch diese Stopp-Kassette sollte jegliche Expression von MyD88 unterdrückt werden. Deshalb wurde die Expression des Proteins mittels Western Blot Analyse in verschiedenen Zelltypen untersucht.

Ergebnisse

4.1.7.1. Analyse der MyD88-Expression in verschiedenen Zelltypen

Isolierte Milzzellen und aus dem Knochenmark generierte GM-CSF DC von MyD88^{stp/stp} Mäusen und den entsprechenden Littermate-Kontrollen wurden lysiert und in der Western Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen den C-terminalen Bereich von MyD88 eingesetzt. Als Beladungskontrolle diente ein Antikörper gegen die MAP-Kinase p38. Heterozygote MyD88^{+/stp} Milz- sowie dendritische Zellen zeigten eine dem Wildtyp vergleichbare Expression von MyD88 (Abb. 16). Eine verminderte Expression aufgrund der Heterozygotie war in beiden Zelltypen nicht zu erkennen. In homozygoten MyD88^{stp/stp} Milzzellen, ebenso wie in homozygoten DC, konnte hingegen keine MyD88 Expression detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Stopp-Kassette funktionell ist und das Gen für MyD88 inaktiviert wurde.

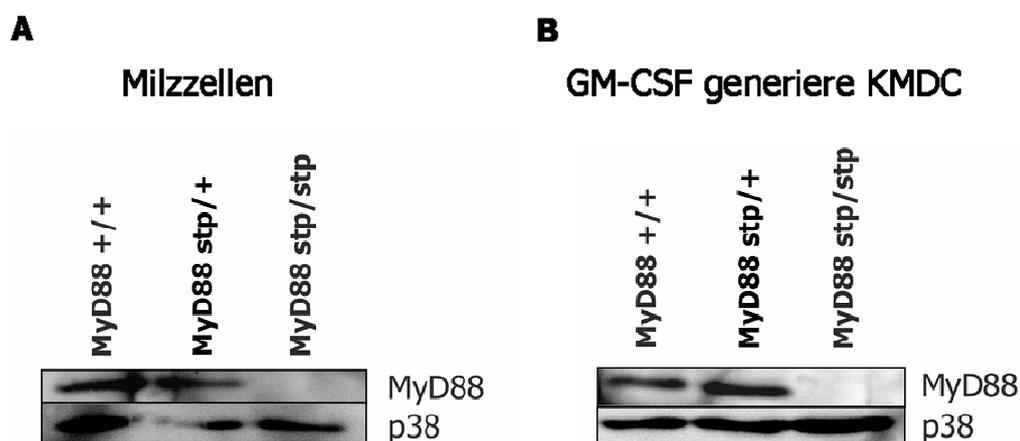


Abb. 16: Expression von MyD88 in MyD88^{stp/stp} Mäusen. Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen den C-terminalen Bereich des Proteins MyD88 in **A** isolierten Milzzellen und **B** GM-CSF generierten Knochenmarks-DC. Als Beladungskontrolle diente ein Antikörper gegen die MAP Kinase p38.

4.1.7.2. Analyse der Zytokinproduktion in MyD88^{stp/stp} Mäusen

Durch das Einbringen der Stopp-Kassette in den *MyD88*-Genlocus und der daraus resultierenden unterdrückten Expression des Proteins MyD88 ist bei MyD88^{stp/stp} Mäusen ein funktioneller Phänotyp zu erwarten, der dem von MyD88^{-/-} Mäusen entspricht, bei denen die Zytokinproduktion nach Stimulation mit TLR-Agonisten stark vermindert ist [28, 30, 70].

Um nachzuweisen, dass der funktionelle Phänotyp von MyD88^{stp/stp} Mäusen mit dem von MyD88^{-/-} Mäusen bezüglich der Zytokinproduktion übereinstimmt, wurden GM-CSF

Ergebnisse

generierte Knochenmarks-DC mit verschiedenen TLR-Agonisten stimuliert und die Produktion des Zytokins IL-6 bestimmt. DC aus dem Knochenmark von MyD88^{-/-}-Mäusen, MyD88^{stp/stp} Mäusen sowie deren Littermate-Kontrollen wurden zunächst durch GM-CSF-Behandlung generiert und anschließend über einen Zeitraum von 16 h mit den TLR-Agonisten Pam₃Cys (TLR2) und CpG2216 (TLR9) stimuliert. Die Agonisten aktivierten jeweils einen MyD88-abhängigen Signalweg über TLR2 bzw. TLR9. Bei der anschließenden Analyse der IL-6 Produktion konnte für MyD88^{-/-} Mäuse keine Produktion des Zytokins nachgewiesen werden, während die Wildtypkontrollen sowohl nach Pam₃Cys- als auch nach CpG2216-Stimulation IL-6-Produktion zeigten (Abb. 17). Die IL-6 Produktion von heterozygoten MyD88^{stp/+}-DC war sowohl nach Stimulation mit Pam₃Cys (Abb. 17A), als auch nach Stimulation mit CpG2216 (Abb. 17B) mit der von Wildtyp-DC vergleichbar.

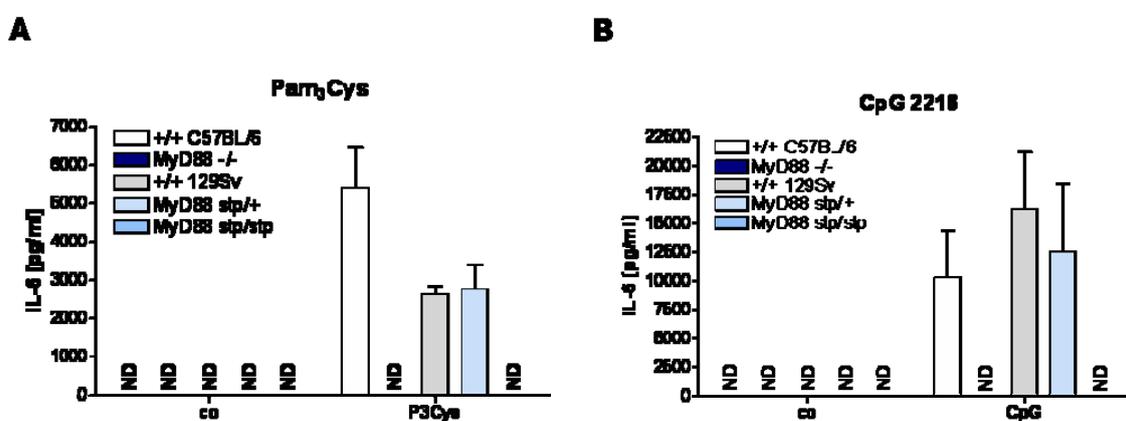


Abb. 17: Zytokinproduktion nach Stimulation mit TLR Agonisten. GM-CSF generierte DC wurden 16 h mit **A** Pam₃Cys und **B** CpG 2216 stimuliert. Mittels ELISA wurde anschließend die IL-6 Konzentration im Überstand der Zellen bestimmt (n=3).

Wie erwartet zeigten die homozygoten MyD88^{stp/stp} DC keine IL-6 Produktion nach Stimulation mit beiden TLR-Agonisten (Abb. 17). Infolgedessen ist der Phänotyp dieser Mäuse mit dem der MyD88 Knockout Mäuse vergleichbar.

Die Funktionalität der Stopp-Kassette ist somit bewiesen und in zukünftigen Arbeiten kann durch Kreuzung mit Mauslinien, die unter der Kontrolle zelltyp-spezifischer Promotoren die Cre-Rekombinase exprimieren eine Reexpression von MyD88 in definierten Zellpopulationen erfolgen.

4.2. Teil 2: Zelltyp-spezifische Regulation der TLR4-stimulierten TNF- α Biosynthese

Der MyD88-unabhängige TLR4-Signalweg wird durch das Adapterprotein TRIF vermittelt. Um die Rolle dieses Adapterproteins in der angeborenen Immunantwort zu untersuchen, generierte die Gruppe von Bruce Beutler (La Jolla, San Diego, USA) eine LPS2-Mausmutante, welche eine verkürzte, nicht funktionale Form des Proteins exprimiert. Die Untersuchung der Zytokinproduktion von Thioglykollat-Makrophagen dieser Mutante verglichen mit Wildtypzellen ergab für TNF- α eine reduzierte Protein-Produktion nach TLR4 Ligation [28]. In Genexpressionsstudien, die in unserem Labor durchgeführt wurden, zeigte sich, dass die mRNA Expression von TNF- α nach TLR4-Stimulation in dendritischen Zellen (DC) nicht reguliert ist [69]. Da dies ein Indiz für eine im Vergleich mit Makrophagen alternativ regulierte Produktion dieses Zytokins in DC darstellt, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Zelltyp-spezifische Regulation der TNF- α Produktion näher untersucht werden.

Da die Gruppe von Bruce Beutler die TNF- α Produktion der Thioglykollat-Makrophagen auf Proteinebene analysiert hat während die bei uns durchgeführten Genexpressionsanalysen die TNF- α Regulation auf mRNA Ebene widerspiegeln, sollte zunächst in beiden Zelltypen parallel die mRNA- und Proteinproduktion nach LPS-Stimulation bestimmt werden.

4.2.1. TNF- α Proteinproduktion in Makrophagen versus DC

Um die Proteinproduktion von TNF- α in Makrophagen und dendritischen Zellen untersuchen zu können, wurden Thioglykollat-induzierte Makrophagen isoliert bzw. dendritische Zellen durch GM-CSF-Behandlung aus dem Knochenmark (KM-DC) generiert. Die Zellen wurden in einer Kinetik mit dem TLR4-Agonisten LPS stimuliert und die TNF- α Produktion anschließend per ELISA bestimmt. Neben WT-Zellen wurden in diesen Experimenten auch TRIF-mutierte Zellen aus LPS2-Mäusen in die Stimulation eingesetzt um den Einfluss des Adapterproteins TRIF auf die TNF- α Produktion in den einzelnen Zelltypen bestimmen zu können. In beiden Zelltypen ist über einen Zeitraum von 20 h eine starke Abhängigkeit der TNF-Produktion von TRIF zu erkennen (Abb. 18).

Ergebnisse

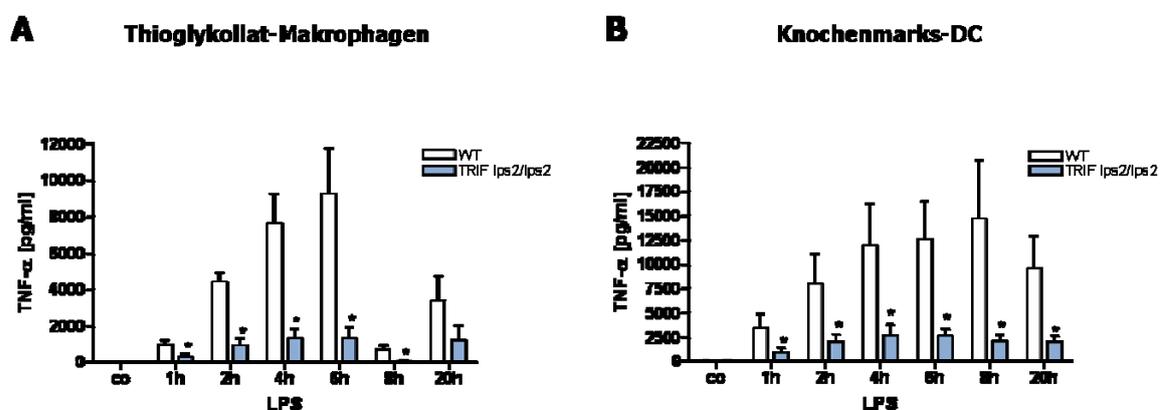


Abb. 18: TNF- α Produktion in Thioglykollat-Makrophagen versus Knochenmarks-DC. Thioglykollat-Makrophagen (n=3) **A** und Knochenmarks-DC (n=7) **B** wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit LPS stimuliert und die TNF- α Konzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt.

Anhand der eingangs erwähnten Genexpressions-Daten war für dendritische Zellen eigentlich keine TRIF-Abhängigkeit zu erwarten, da die RNA-Expression nicht durch TRIF reguliert wird. Diese Diskrepanz sollte durch weitere Analysen der mRNA-Expression in beiden Zelltypen genauer analysiert werden.

4.2.2. mRNA-Produktion von TNF- α in Makrophagen versus DC

Die TNF- α mRNA Expression wurde mittels quantitativer „real-time“-PCR (RT-PCR) bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Thioglykollat-Makrophagen und KM-DC zu verschiedenen Zeitpunkten mit LPS stimuliert. Nach Isolation der RNA aus den Zellen wurde diese durch eine Reverse Transkriptase-Reaktion in cDNA umgeschrieben und als „Template“ in die RT-PCR eingesetzt. Die Expression von TNF- α ist in Abb. 19 gegen das „house-keeping“ Gen β -Aktin normalisiert und auf eine unstimulierte Kontrolle bezogen dargestellt. Grundsätzlich ist in Makrophagen eine höhere Induktion der TNF- α mRNA Expression als in dendritischen Zellen zu beobachten. Die mRNA-Expression in TRIF-mutierten Makrophagen ist jedoch signifikant reduziert gegenüber der des Wildtyps. In DC ist nach 1 h bzw. 2 h nach Stimulation mit LPS kein Unterschied in den mRNA-Level der Wildtypzellen und TRIF-mutierten Zellen zu erkennen. Ab einem Zeitpunkt von 4 h nach LPS-Stimulation zeigen TRIF-mutierte DC dagegen eine signifikant erhöhte TNF- α mRNA-Expression gegenüber der von Wildtypzellen. Die ermittelte TRIF-abhängige mRNA-Produktion in Makrophagen ist konsistent mit der unter 4.2.1. analysierten TRIF-abhängigen TNF- α Proteinproduktion. In diesem Zelltyp scheint TRIF auf

Ergebnisse

transkriptioneller Ebene zu regulieren oder den Signalweg zur Transkription zu beeinflussen. In DC wurde ebenfalls eine TRIF-abhängige Proteinproduktion beobachtet. Da die mRNA-Level in TRIF-mutierten DC jedoch nicht reduziert waren, wird ein Einfluss von TRIF auf posttranskriptioneller Ebene vermutet.

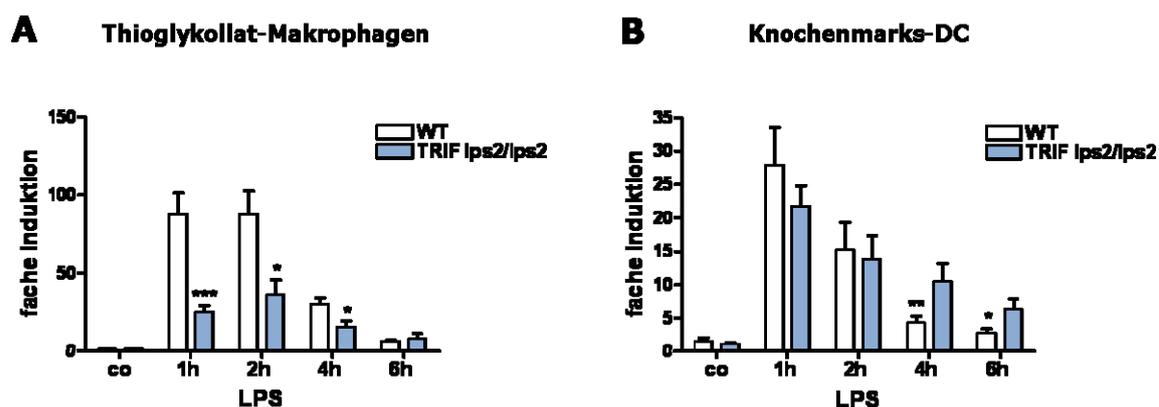


Abb. 19: TNF- α mRNA Produktion in Thioglykollat-Makrophagen versus Knochenmarks-DC. Thioglykollat-Makrophagen (n=3) **A** und Knochenmarks-DC (n=6) **B** wurden über verschiedene Zeiträume mit LPS stimuliert; anschließend die RNA dieser Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und als „Template“ in der RT-PCR eingesetzt. Die Expression von TNF- α ist im Verhältnis zu β -Aktin und bezogen auf die unstimulierte Kontrolle dargestellt.

Bevor die Regulation der TNF-Produktion in DC detaillierter untersucht werden sollte, musste zunächst aufgeklärt werden, welcher der beiden derzeit bekannten TLR4-induzierten TRIF-abhängigen Signalwege eine TNF- α Produktion hervorruft.

4.2.3. Einfluss des Typ I IFN-abhängigen Signalweges auf die TNF- α Produktion

Das Adapterprotein TRIF vermittelt den MyD88-unabhängigen TLR4-Signalweg über zwei derzeit bekannte Achsen. Einerseits aktiviert TRIF über TRAF6 bzw. RIP1 neben MAP Kinasen den Transkriptionsfaktor NF- κ B, der in den Kern transloziert und dort die Expression inflammatorischer Gene hervorruft. Des weiteren wird durch TRIF ein Transkriptionsfaktor namens IRF-3 aktiviert. Dieser induziert die Produktion von IFN- β , das über den IFN α/β -Rezeptor die Transkription IFN-induzierter Gene vermittelt [31, 32]. Um den für die TNF- α Produktion verantwortlichen Signalweg zu identifizieren, wurde zunächst der über IRF-3 agierende Typ I IFN-abhängige Signalweg untersucht. Hierzu wurden Knochenmarks-Makrophagen und DC von IFNARI^{-/-}-Mäusen generiert und mit

Ergebnisse

verschiedenen TLR-Agonisten stimuliert. Als Kontrolle für den TRIF-unabhängigen Signalweg wurde neben LPS zusätzlich mit dem TLR9-Agonisten CpG und dem TLR2/6 Agonisten MALP stimuliert. In diesem Fall sollte kein Unterschied der TNF- α Produktion zwischen Knockout- und Wildtypzellen vorliegen. Nach 16 h wurde die TNF- α Produktion im Überstand mittels ELISA bestimmt. Sowohl Makrophagen, als auch DC der IFNARI^{-/-} Mäuse zeigten mit denen der Wildtypzellen vergleichbare TNF- α Level (Abb. 20). Aufgrund dieser Daten kann der Signalweg über IRF-3 für die TNF- α -Produktion ausgeschlossen werden.

Eine NF- κ B- oder MAP Kinasen-abhängige Signaltransduktion wird deshalb für die TNF- α Produktion postuliert. In nachfolgenden Untersuchungen wurde aus diesem Grunde der Typ I IFN-unabhängige Signalweg detaillierter untersucht.

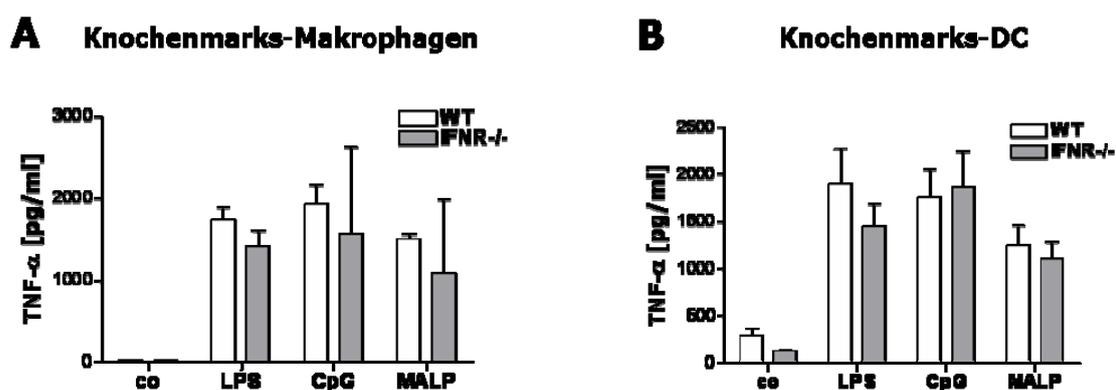


Abb. 20: TNF- α Produktion in IFNARI^{-/-} Mäusen. Knochenmarks-Makrophagen (n=4) **A** und Knochenmarks-DC (n=6) **B** wurden 16 h mit den TLR Agonisten LPS, CpG und MALP stimuliert und anschließend die TNF- α Konzentration im Überstand per ELISA bestimmt.

4.2.4. Aktivierung des TypI-IFN unabhängigen Signalweges in TRIF-mutierten DC

Aufgrund der Diskrepanz zwischen TNF- α mRNA- und Proteinproduktion in DC wurde für weitere Experimente das Hauptaugenmerk auf diesen Zelltyp gelegt und zunächst die TRIF-abhängige Aktivierung des Typ I IFN-unabhängigen Signalweges analysiert. Neben NF- κ B werden über diesen Weg MAP Kinasen aktiviert. Die MAP Kinase JNK phosphoryliert ATF2 und c-Jun, deren Bindung an den TNF- α Promotor die Transkription des Proteins mitinduziert [24, 25]. Anhand von Western Blot Analysen wurde zunächst durch Untersuchung des Phosphorylierungsstatus die JNK-Aktivierung in TRIF-mutierten DC untersucht.

Ergebnisse

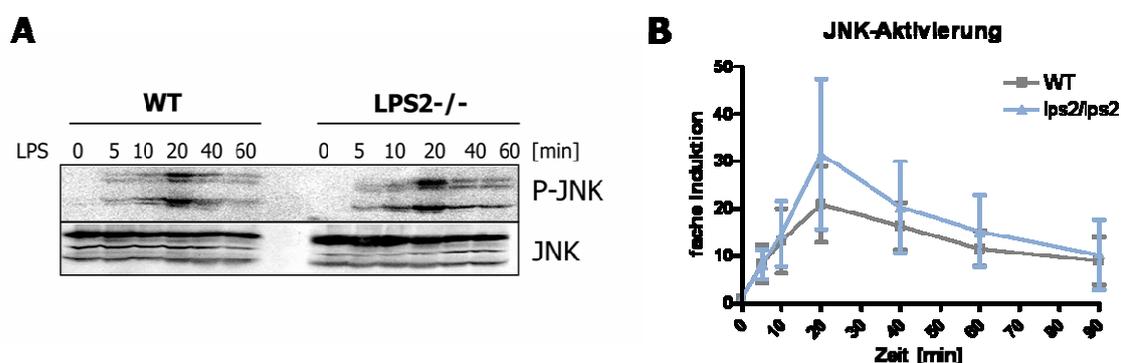


Abb. 21: Analyse der JNK-Aktivierung. Knochenmarks-DC wurden über verschiedene Zeiträume mit LPS stimuliert und der Phosphorylierungsstatus mittels Western Blot analysiert. **A** zeigt exemplarisch einen Blot. Das JNK-Gesamtprotein ist als Beladungskontrolle dargestellt. Der Graph **(B)** zeigt die densitometrisch bestimmte relative Intensität des P-JNK Signales bezogen auf die Menge an JNK-Gesamtprotein (n=3).

Über einen Zeitraum von 1 h LPS-Stimulation ist kein Unterschied im Aktivierungsmuster zwischen TRIF-mutierten und Wildtypzellen zu erkennen. Abb. 21A zeigt exemplarisch einen Western Blot. In Abb. 21B ist die densitometrische Auswertung dreier Experimente zusammengefasst dargestellt.

Im Folgenden sollten Untersuchungen der I κ B α -Aktivierung Aufschluss über die Beteiligung von TRIF an der NF- κ B-Aktivierung in DC liefern. Im TLR4-Signalweg erfolgt durch I κ B-Kinasen (IKK) eine Phosphorylierung des I κ B α Proteins woraufhin dieses aktiviert und polyubiquitiniert wird. Daraus resultiert die Degradation von I κ B α , und NF- κ B wird aus dem I κ B-NF- κ B-Komplex freigesetzt. Es kann in den Kern translozieren um dort die Genexpression proinflammatorischer Zytokine zu induzieren [22, 23]. Sowohl die Untersuchung des Phosphorylierungsstaus von I κ B α als auch dessen Degradation gibt Aufschluss über die Aktivierung des Proteins. Abb. 22 zeigt jeweils eine repräsentative Western Blot Analyse der LPS-stimulierten DC für die Phosphorylierung (Abb. 22A) und Degradation (Abb. 22B) des I κ B α Proteins aus drei durchgeführten Experimenten. In Form von Zahlen ist in Abb. 22 die mittels Densitometrie bestimmte relative Intensität bezogen auf die jeweilige Beladungskontrolle dargestellt.

Ergebnisse

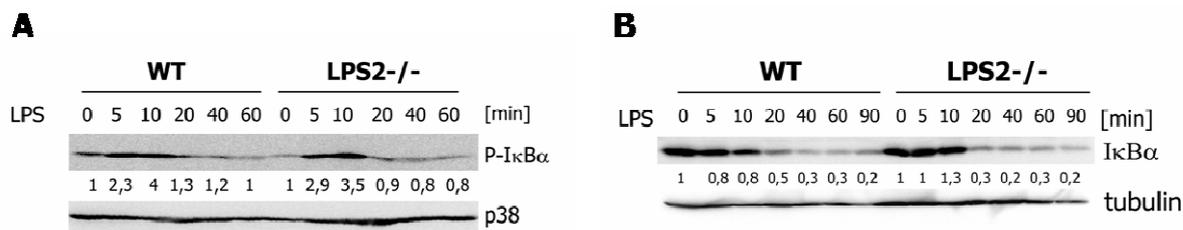


Abb. 22: Analyse der IκBα-Aktivierung. Knochenmarks-DC wurden über verschiedene Zeiträume mit LPS stimuliert und **(A)** der Phosphorylierungsstatus per Western Blot analysiert. Durch Detektion mit einem Antikörper gegen IκBα **(B)** sollte die Degradation des Proteins untersucht werden. Als Beladungskontrolle diente in Blot **A** die MAP Kinase p38 und in Blot **B** Tubulin. In Form von Zahlen ist die densitometrisch bestimmte relative Intensität bezogen auf die jeweilige Beladungskontrolle dargestellt.

Sowohl die Phosphorylierung, als auch die Degradation von IκBα in TRIF-mutierten DC war vergleichbar mit der in Wildtypzellen. Somit kann in diesem Zelltyp nicht von einem transkriptionellen Einfluss von TRIF auf die Regulation von TNF-α ausgegangen werden, was im Einklang mit den oben beschriebenen Daten zur LPS-induzierten mRNA Produktion steht. Demzufolge sollten die beobachteten verminderten TNF-α Proteinlevel nach LPS-Stimulation in DC entweder durch eine regulierende Funktion von TRIF bei der mRNA-Translation oder bei der Sekretion des Proteins bedingt sein.

4.2.5. Einfluss von TRIF auf die Sekretion von TNF-α in DC

Um einen eventuellen Einfluss des Adapterproteins TRIF auf die Sekretion von TNF-α ausschließen zu können, wurden Knochenmarks-DC von LPS2 Mäusen über verschiedene Zeiträume stimuliert und die durch einen ELISA bestimmte Menge des intrazellulären TNF-α (Lysat) der sekretierten Proteinmenge (Überstand) gegenübergestellt (Abb. 23). Da die Lysat-Proben der LPS2-DC signifikant verminderte TNF-α Level gegenüber Wildtypzellen aufweisen, kann eine Regulation der TNF-α Sekretion durch TRIF in DC ausgeschlossen werden. Im Folgenden wurde deshalb der Einfluss von TRIF auf die Translation von TNF-α mRNA untersucht.

Ergebnisse

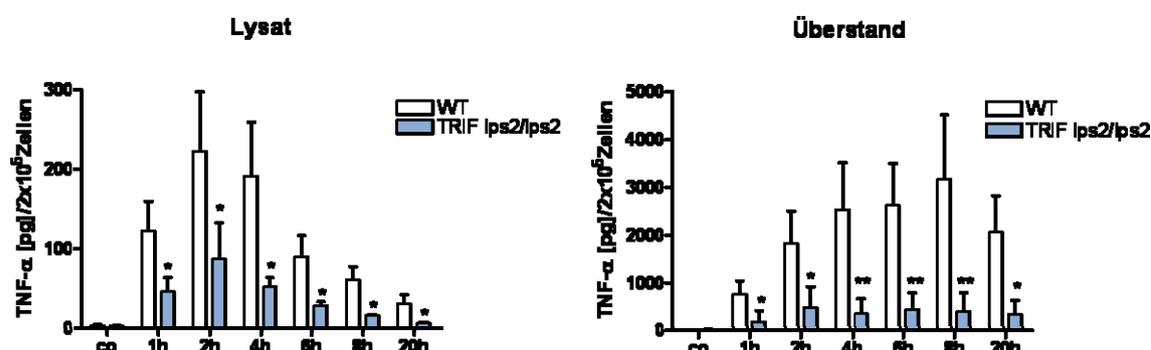


Abb. 23: TNF- α Protein: Lysat versus Überstand. Knochenmarks-DC wurden über verschiedene Zeiträume mit LPS stimuliert und anschließend lysiert. Mittels ELISA wurden die TNF- α Mengen des Lysates und des Zell-Überstandes bestimmt. (n=6)

4.2.6. Einfluss von TRIF auf die Translation der TNF- α mRNA

Der p38 MAP Kinase Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der posttranskriptionellen Regulation von inflammatorischen Genen. p38 wird sowohl eine Rolle bei der Stabilisierung als auch bei der Translation mRNA inflammatorischer Gene zugeschrieben. AU-reiche Regionen in der 3' untranslatierten Region (ARE) der mRNA sind charakteristisch für p38 regulierte mRNA [71-73]. Das Zytokin TNF- α , dessen Biosynthese bekanntermaßen durch p38 reguliert wird weist ebenfalls eine ARE auf [73]. Um zu untersuchen ob diese p38 vermittelte Regulation durch das Adapterprotein TRIF gesteuert wird sollte im Folgenden die Aktivierung dieser MAP Kinase untersucht werden.

4.2.6.1. Aktivierung der p38 MAPKinase in dendritischen Zellen

Mittels Western Blot-Analyse wurde die Aktivierung der p38 MAP Kinase in DC anhand des p38-Phosphorylierungsstatus bestimmt. In Abb. 24A ist ein repräsentativer Western Blot aus drei Experimenten dargestellt. Abb. 24B zeigt die densitometrische Auswertung der drei Experimente wobei in der Graphik die relative Intensität normalisiert auf das Gesamtprotein dargestellt ist. Während die Aktivierung in Wildtypzellen rasch auf ein Dreifaches ansteigt, über einen Zeitraum von 1 h anhält und dann wieder auf das Ausgangsniveau abfällt, ist in TRIF-mutierten Zellen eine ebenso intensive, jedoch verkürzte Aktivierung zu beobachten (Abb. 24).

Ergebnisse

Dies zeigt sich daran, dass sich die Aktivierung der Kinase bereits 40 min nach LPS-Stimulation wieder auf dem Ausgangslevel befindet. Somit kann TRIF eindeutig eine Rolle in der späten Aktivierung der MAP Kinase p38 zugeschrieben werden.

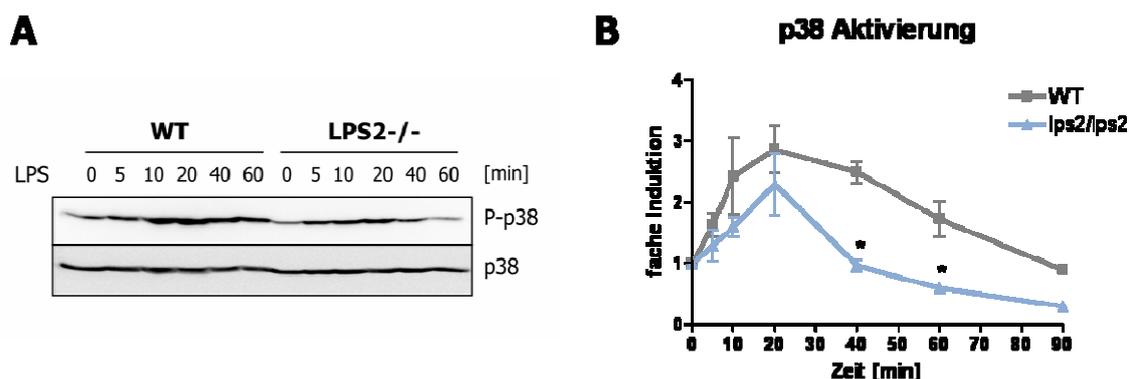


Abb. 24: Aktivierung der p38 MAP Kinase. Knochenmarks-DC wurden über verschiedene Zeiträume mit LPS stimuliert und der Phosphorylierungsstatus per Western Blot analysiert. In **A** ist exemplarisch ein Blot dargestellt wobei das Gesamtprotein p38 als Beladungskontrolle diente. Der Graph in **B** zeigt die mittels Densitometrie bestimmte relative Intensität des P-p38 Signales auf p38-Gesamtprotein bezogen (n=3).

Aus der Literatur ist bekannt, dass die MAP Kinase p38 im Nukleus mit ihrer Zielkinase MAPKAPK 2 (MK2) einen Komplex bildet. Wird p38 aktiviert phosphoryliert sie im Gegenzug MK2. Durch diese Modifikation wird eine Nukleus-Export-Sequenz (NES) bei MK2 frei, die einen Transport der Kinase in das Zytosol vermittelt (Abb. 25). Aufgrund der Komplexbildung wird p38 coexportiert [74, 75]. Im Zytosol können durch beide Kinasen weitere Zielproteine aktiviert werden wodurch Stabilität und Translation von mRNAs reguliert wird [76]. Eine Rolle von MK2 bei der Regulation der TNF- α Biosynthese ist beschrieben. MK2^{-/-} Mäuse zeigen reduzierte TNF- α Proteinlevel nach LPS-Stimulation während die mRNA-Synthese von TNF- α vergleichbar mit der in Wildtypmäusen ist. Der Phänotyp dieser Knockout Mäuse ist mit den Beobachtungen für TRIF-mutierte DC vergleichbar. Da zudem eine TRIF-abhängige späte p38 Aktivierung beobachtet wurde, ist aufgrund der bekannten Aktivierungskaskade eine beeinträchtigte MK2-Aktivität zu erwarten. Dies sollte durch nachfolgende Untersuchung der Zielkinase MK2 in TRIF-mutierten DC geklärt werden.

Ergebnisse

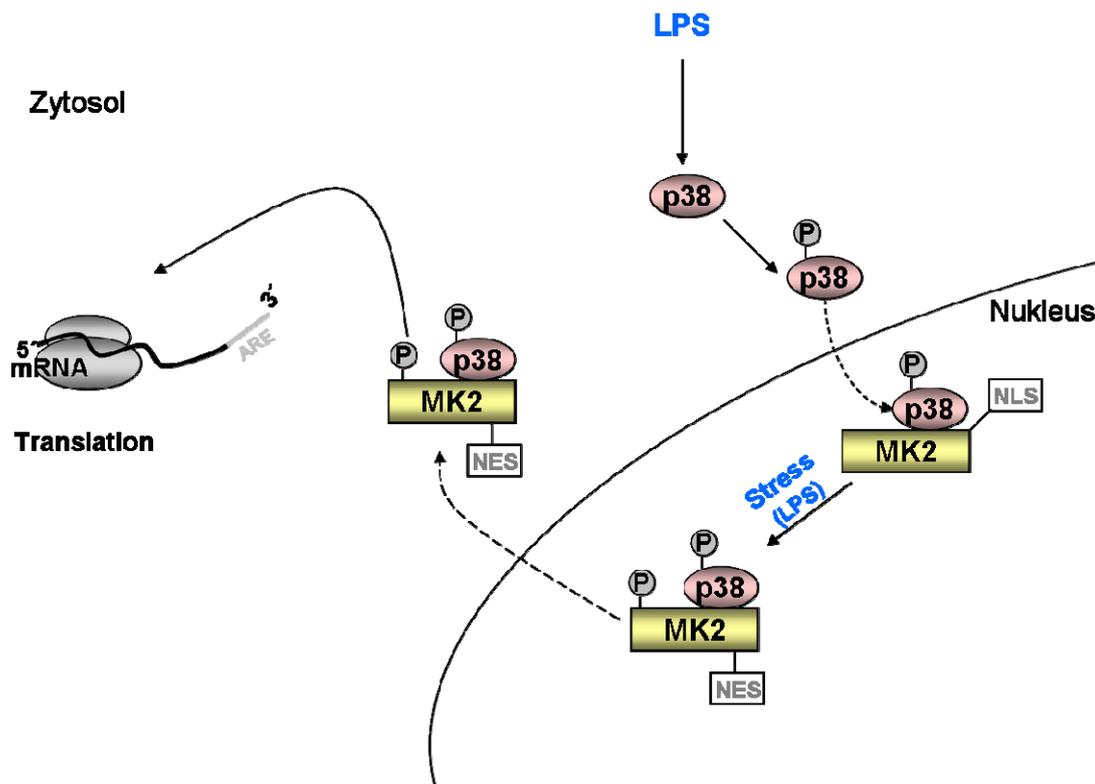


Abb. 25: Modell der MK2-Aktivierung. p38 geht mit ihrem Zielprotein MK2 einen Komplex ein. Durch LPS-Stimulation kommt es zur Phosphorylierung von MK2 durch p38. Dadurch wird im C-terminalen Bereich von MK2 eine NES (nuclear export signal)-Sequenz zugänglich, woraus ein Transport der Kinase MK2 und ein Kotransport von p38 in das Zytosol resultiert. Im Zytosol ist MK2 in die posttranskriptionelle Regulation von Zytokinen, unter anderem TNF- α , involviert.

4.2.6.2. Aktivierung der MAPKAP Kinase2 (MK2) in dendritischen Zellen

Anhand des Phosphorylierungsstatus wurde die Aktivierung der MAP Kinase MK2 untersucht. Abb. 26 zeigt einen repräsentativen Blot (Abb. 26A) sowie die densitometrische Auswertung der durchgeführten vier Experimente (Abb. 26B). In Wildtypzellen steigt die MK2 Aktivierung bereits 5 min nach Stimulation auf das 2- bis 3-fache an und beginnt nach 60 min abzufallen. Ab einem Zeitpunkt von 90 min nach LPS-Stimulation ist die Aktivierung wieder auf dem Ausgangslevel. Wie aus Abb. 26B deutlich hervorgeht, ist in TRIF-mutierten DC verglichen mit Wildtypzellen bereits 10 min nach LPS-Stimulation eine signifikant reduzierte Aktivierung von MK2 zu beobachten. Somit ist in dendritischen Zellen die MK2 Aktivierung bereits zu frühen Zeitpunkten TRIF-abhängig.

Ergebnisse

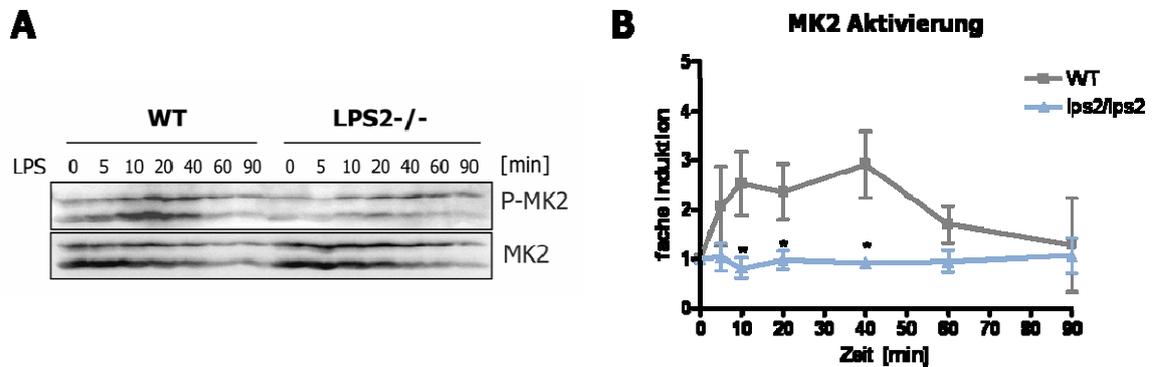


Abb. 26: MAPKAP Kinase 2 (MK2)-Aktivierung. Knochenmarks-DC wurden zu angegebenen Zeitpunkten mit LPS stimuliert und der Phosphorylierungsstatus per Western Blot analysiert. **A** zeigt einen repräsentativen Blot aus vier Experimenten. Als Beladungskontrolle ist MK2-Gesamtprotein dargestellt. In **B** ist die mittels Densitometrie ermittelte relative Intensität des P-MK2 Signales bezogen auf MK2-Gesamtprotein dargestellt (n=4).

Es ist anzunehmen, dass in TRIF-mutierten DC aufgrund der mangelnden MK2-Aktivierung der Transport des Kinasekomplexes ins Zytosol beeinträchtigt ist und daraus resultierend die Translation der mRNA eingeschränkt ist. Dies hat eine verminderte TNF- α Proteinproduktion zur Folge, die in eingangs gezeigten Experimenten für DC beschrieben wurde.

5. Diskussion

5.1. Generierung eines MyD88^{stp/stp} Mausstammes

Das angeborene Immunsystem bildet den ersten Abwehrmechanismus des Organismus gegen Pathogene. Unterschiedlicher Erkennungssysteme sind daran beteiligt Mikroorganismen aufzuspüren und in Folge eine Immunreaktion auszulösen. Dabei spielen Toll-like Rezeptoren (TLRs), die nach Pathogen-Erkennung intrazelluläre Signalwege induzieren, woraus wiederum die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine resultieren, eine essentielle Rolle. In diesem Rahmen wurde MyD88 als das zentrale Adapterprotein für die Familie der TLR-Rezeptoren, mit der Ausnahme von TLR3, identifiziert [77]. Untersuchungen dieses Adapterproteins in einem murinen Sepsis-Modell (CASP; colon ascendens stent peritonitis) bestätigen die zentrale Bedeutung von MyD88 für die systemische Immunantwort. So zeigen MyD88-defiziente Mäuse eine gesteigerte Überlebensrate und ihre systemische Zytokinproduktion ist gegenüber Wildtypmäusen stark reduziert [52]. Organ-spezifische Untersuchungen zeigten interessanterweise eine differentielle MyD88-Abhängigkeit der Zytokin- und Chemokinproduktion. Die verschiedenen Organe tragen somit über unterschiedliche Mechanismen zur Immunantwort bei. Da in den jeweiligen Organen verschiedene Zelltypen an der systemischen Zytokinproduktion im Rahmen der angeborenen Immunantwort beteiligt sind, ist der zelltyp-spezifische Beitrag zur Immunantwort folglich von großem Interesse.

Um den TLR-vermittelten Einfluss einzelner Zelltypen auf die angeborene Immunantwort *in vivo* untersuchen zu können, sollte ein Mausmodell etabliert werden, das eine spezifische Expression des zentralen Adapterproteins MyD88 in definierten Zellpopulationen ermöglicht. Für derartige Untersuchungen der zelltyp-spezifischen Funktion bestimmter Proteine *in vivo* bietet sich das konditionale System der „switch-on“-Mutagenese (Anschalten eines Gens) an, welches die gezielte Expression eines Gens in definierten Zellpopulationen ermöglicht. Der Unterschied der „switch-on“ Strategie gegenüber dem gezielten Ausschalten der Genexpression in definierten Zelltypen ist die Möglichkeit den Funktionsgewinn einzelner Zellpopulationen als Phänotyp untersuchen zu können. Da durch konditionale Systeme jedoch keine 100%-igen Effekte zu erwarten sind, besteht beim gezielten Ausschalten der Expression eines einzelnen Gens die Gefahr, dass ungeachtet dessen eine geringe Menge des vom Gen kodierten Proteins exprimiert wird. Bei der „switch-on“ Strategie hingegen kommt es zwar möglicherweise nicht zur 100%-igen Reexpression des Gens, jedoch sind auftretende Effekte in jedem Fall unmissverständlich auf den Funktionsgewinn durch das reexprimierte Protein zurückzuführen.

Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Mausstamm generiert, der eine mit *loxP*-Erkennungssequenzen flankierte Stopp-Kassette im *MyD88*-Genlokus enthält (*MyD88^{stp/stp}*). In weiterführenden Arbeiten kann durch Kreuzung dieses Stammes mit Mauslinien, die unter der Kontrolle von zelltyp-spezifischen Promotoren die Cre-Rekombinase exprimieren, in definierten Zellpopulationen die Stopp-Kassette entfernt und *MyD88* reexprimiert werden. Auf diese Weise werden Mauslinien generiert, die in einem spezifischen Zelltyp *MyD88* exprimieren, während alle übrigen Zellen defizient für dieses Protein bleiben.

Die Generierung der *MyD88^{stp/stp}* Mauslinie erfolgte durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) des Mausstammes 129Sv. Die Stopp-Kassette wurde hierfür an beiden Seiten mit unterschiedlich langen homologen Bereichen („kurzer“- bzw. „langer Arm“) flankiert und der so erhaltene Rekombinationsvektor mittels Elektroporation in die ES-Zellen eingebracht. Nach erfolgter homologer Rekombination wurden aus insgesamt 556 untersuchten Klonen durch PCR-Screening 5 positive Klone identifiziert. Die genetisch korrekte Integration des Vektors ins Genom konnte für 3 (#88, #96 und #160) dieser 5 Klone mittels Southern Blot Analyse verifiziert werden. Zusätzliche unerwünschte Integrationen des Targetvektors ins Genom konnten anhand der lacZ-Southern Blot-Analyse ausgeschlossen werden. In den beiden ES-Zell-Klonen #16 und #31 scheint allerdings bei der homologen Rekombination am 3'-Vektor/Genom-Übergang das Exon6 modifiziert bzw. deletiert worden zu sein, da die 3'-flankierende Sonde in der Southern Blot Analyse kein Signal zeigte, jedoch der 5'-Genom/Vektor-Übergang laut PCR-Analyse korrekt ist.

Im Weiteren sollte durch *in vitro* Cre-Rekombination die Neomycin-Resistenz-Kassette aus dem mutierten Allel entfernt werden. Ziel dabei war es, ein Allel mit 2 *loxP*-Stellen zu erzeugen, um so bei anschließender *in vivo* Cre-Rekombination nur ein einziges Rekombinationsereignis zu ermöglichen. Bei Verbleib der anfänglich 3 *loxP*-Sequenzen im mutierten Allel würden daraus statistisch betrachtet 3 Möglichkeiten der Rekombination resultieren. Eine Rekombination der beiden ersten *loxP*-Erkennungssequenzen würde dabei zur Deletion der Stopp-Kassette führen, während die Neomycin-Resistenz-Kassette im Allel erhalten bliebe. Unter diesen Umständen ist eine Reexpression von *MyD88* nicht zu erwarten, da die Neomycin-Resistenz-Kassette eine eigenständige transkriptionelle Einheit darstellt. Zudem wird die Insertion der Neomycin-Resistenz-Kassette als Strategie der Generierung von Knockoutmäusen verwendet [78]. Bei Rekombination der beiden *loxP*-Erkennungssequenzen, die die Neomycin-Resistenz-Kassette flankieren, würde aufgrund der noch vorhandenen Stopp-Kassette im *MyD88*-Lokus ebenfalls keine Reexpression stattfinden. Folglich könnten diese Rekombinationsereignisse dazu führen, dass bei Verbleib der 3 *loxP*-Stellen im Allel (3*loxP*-Allel) aus dem für die Reexpression von *MyD88* gewählten Zelltyp Subpopulationen entstehen, die eine unterschiedliche Reexpression von *MyD88* aufweisen.

Diskussion

Die Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette sollte durch Elektroporation der rekombinanten ES-Zellen mit dem Cre exprimierenden Plasmid erfolgen. Angesichts der hohen Effizienz des Cre Enzymes wurde das Plasmid titriert. Ungeachtet dessen fand eine vollständige Rekombination statt, wodurch sowohl die Neomycin-Resistenz-Kassette als auch die Stopp-Kassette aus dem Allel deletiert wurden. Eine Southern Blot-Analyse der rekombinierten ES-Zell-Klone mit sowohl der 3'-flankierenden Sonde im Exon6 und einer neo-Sonde zeigte, dass entweder keine oder aber eine vollständige Rekombination erfolgte. Daraus kann auf eine gute Zugänglichkeit des *MyD88*-Genlokus geschlossen werden. Bei *in vivo* vermittelter Cre-Rekombination ist somit ein ähnliches Rekombinationsmuster zu erwarten. Allerdings sollte dabei beachtet werden, dass sich die Situation in ES-Zellen von der in adulten Zellen durchaus unterscheiden kann. Die Gruppe um Shizuo Akira konnte jedoch durch *in vivo* Cre-Rekombination eines 3loxP-Alleles, vermittelt durch Cre unter Kontrolle des CD19 Promoters, zeigen, dass auch unter diesen Bedingungen eine vollständige Rekombination erfolgt, die in einer homogenen Zellpopulation resultiert [79]. Ein Vorteil des Verbleibs der Neomycin-Resistenz-Kassette im mutierten Allel ist die Tatsache, dass es sich bei dieser Resistenz-Kassette um eine eigenständige funktionelle Transkriptionseinheit handelt, was einen zusätzlichen Faktor für die Unterdrückung der MyD88-Expression darstellt. Da die Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette aus oben genannten Gründen nicht erzielt wurde, fand die Generierung des MyD88^{stp/stp} Mausstammes unter Verwendung der homolog rekombinierten ES-Zellen, die das 3loxP-Allel enthalten, statt.

Nach Implantation von 2 der 3loxP-ES-Zell-Klone in C57BL/6-Blastozysten erfolgte für einen der beiden Klone (#88) eine Keimbahntransmission, wodurch nach weiterer Verpaarung homozygote MyD88^{stp/stp} Mäuse generiert werden konnten. Der erwartete Genotyp dieser MyD88^{stp/stp} Mäuse konnte durch Southern Blot Analyse mit der 3'-flankierenden Sonde verifiziert werden. Der generierte Mausstamm entwickelt sich normal, ist fertil und zeigt die erwartete Mendelsche Frequenz, was auch für MyD88^{-/-} Mäuse beschrieben wurde [77].

5.2. Charakterisierung des generierten MyD88^{stp/stp} Mausstammes

Die Funktionalität der integrierten Stopp-Kassette konnte durch eine unterdrückte Expression von MyD88 in isolierten Milz- sowie in GM-CSF generierten dendritischen Zellen (DC) nachgewiesen werden. Ein Gen-Dosis-Effekt der Heterozygotie auf die Expression von MyD88 konnte nicht beobachtet werden. Bestätigt wird die vollständige Inaktivierung der Funktionalität des *MyD88*-Gens auch durch die Tatsache, dass in MyD88^{stp/stp} Mäusen nach Stimulation mit Agonisten für TLR2 und TLR9, deren Signalweg ausschließlich über MyD88 verläuft, keine Produktion des Zytokins IL-6 erfolgt. Die IL-6 Produktion in GM-CSF generierten DC heterozygoter MyD88^{stp/+} Mäuse war hingegen sowohl nach Stimulation

mit Pam₃Cys (TLR2) als auch nach Stimulation mit CpG (TLR9) vergleichbar mit der in Wildtypzellen. Dieser Befund bestätigt ebenfalls das oben postulierte Ausbleiben eines Gen-Dosis-Effekts auf die *MyD88*-Genexpression, welche demzufolge offenbar einer engen Kontrolle unterliegt. Unterstützt wird diese Hypothese durch *in vitro* Befunde, die zeigen, dass bereits bei einer geringen Überexpression von MyD88 eine Signaltransduktion ausgelöst wird. Die beobachteten unterschiedlichen Level in der IL-6 Produktion der jeweiligen Wildtypkontrollen sind vermutlich auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Inzuchtstämme C57BL/6 und 129Sv zurückzuführen. Nach zehn Generationen von Rückkreuzungen mit C57BL/6 sollten die Level jedoch gleich sein, da dann sichergestellt ist, dass das eingeführte Gen in der Mauslinie größtenteils von heterogenen Genen des 129Sv Stammes frei ist.

Derzeit werden MyD88^{stp/stp} Mäuse mit sogenannten Cre Deletermäusen, die ubiquitär die Cre-Rekombinase exprimieren, verpaart. Dadurch erfolgt bereits in der Keimbahn am mutierten MyD88-Allel die Cre vermittelte Rekombination, wodurch folglich in allen Zellen und Geweben dieser Tiere MyD88 reexprimiert werden sollte. Anhand dieser Mäuse soll ein Einfluss der verbleibenden *loxP*-Erkennungssequenz im Genloкус auf die *MyD88* Genexpression ausgeschlossen werden. Da sich die verbleibende *loxP*-Stelle im Intron des *MyD88*-Gens befindet, ist ein Einfluss nicht zu erwarten. Dennoch sollte dies überprüft werden, bevor eine Verpaarung mit weiteren Cre-Mäusen erfolgt.

5.3. Ausblick 1

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte *in vivo* Modell bietet die Basis für eine Reexpression des Adapterproteins MyD88 in definierten Zellpopulationen. So soll durch Kreuzung des MyD88^{stp/stp} Mausstammes mit LysMCre Mäusen [80] in zukünftigen Arbeiten eine Reexpression von MyD88 in myeloiden Zellen induziert werden. Anhand verschiedener Infektionsmodelle soll anschließend der MyD88-vermittelte Beitrag myeloider Zellen zur Immunantwort analysiert werden. Ein Ziel der Untersuchungen ist dabei aufzuklären, ob im Tiermodell der Sepsis (CASP) eine Expression von MyD88 in myeloiden Zellen ausreichend ist um die Anfälligkeit dieser Mäuse verglichen mit MyD88^{-/-} Mäusen zu erhöhen und gleichzeitig die Überlebensrate der Mäuse herabzusetzen. Auf diese Weise kann gezeigt werden ob MyD88 in myeloiden Zellen ursächlich ist für die Immunpathologie. Neben dem CASP-Modell ist die Untersuchung der Mäuse im *Listeria monocytogenes*-Infektionsmodell von Interesse. Dem polymikrobiellen Modell der CASP wird auf diese Weise ein monobakterielles Infektionssystem gegenübergestellt. MyD88^{-/-} Mäuse zeigen in diesem monobakteriellen Modell im Vergleich zu Wildtypmäusen eine erhöhte Empfindlichkeit [81]. Die MyD88-abhängige TNF- α Produktion spielt in diesem Modell eine entscheidende Rolle bei der bakteriellen Beseitigung in der frühen Infektionsphase. Interessant ist folglich, ob eine Reexpression von MyD88 in myeloiden

Zellen für die Keimabwehr und das verbesserte Überleben der Mäuse in diesem Modell ausreichend ist.

Der Beitrag von MyD88 myeloider Zellen zur Immunreaktion soll neben der akuten Infektion auch im Modell der chronischen Entzündung untersucht werden. Hierfür ist die Analyse der Mäuse im Kolitismodell vorgesehen. Ein Modell der experimentellen Kolitis in der Maus stellt die IL-10^{-/-} Maus dar, die aufgrund der Defizienz eine spontane kommensal-induzierte Entzündung entwickelt [82]. Rakoff-Nahoum et. al konnten zeigen, dass IL-10^{-/-} MyD88^{-/-} Mäuse über einen Zeitraum von 1,5 Jahren keine spontane Kolitis entwickeln [83]. IL-10 ist folglich ein Negativregulator der MyD88-abhängigen kommensal-induzierten Entzündung. Durch Kreuzung der IL-10-defizienten Mäuse mit Mäusen, die ausschließlich in myeloiden Zellen MyD88 exprimieren, soll der MyD88-vermittelte Beitrag myeloider Zellen zur Zytokinproduktion sowie zur Entwicklung und Ausprägung der chronisch entzündlichen Darmerkrankung untersucht werden.

Ferner ist eine Reexpression von MyD88 in Endothelzellen geplant, die durch Kreuzung der MyD88^{stp/stp} Mäuse mit Tie-2Cre Mäusen [84, 85] erzielt werden kann. Mit Hilfe des auf diese Weise erhaltenen Mausstammes soll aufgeklärt werden, ob Endothelzellen durch eigenständige Pathogenerkennung unmittelbar an der Auslösung sowie der Regulation der Entzündungsantwort beteiligt sind.

Durch detaillierte Kenntnisse über die exakten Wirkmechanismen in den einzelnen Zelltypen des angeborenen Immunsystems kann die Pathophysiologie systemischer Infektionen besser verstanden werden, was im besten Falle zu neuen, verbesserten Therapiestrategien führen kann.

5.4. Zelltyp-spezifische Regulation der TNF- α Biosynthese

Als weiterer Aspekt der Zelltyp-Spezifität sollte in der vorliegenden Arbeit die Regulation der TNF- α Biosynthese in DC und Makrophagen untersucht werden. Bisherige *in vitro* Studien der TLR4-vermittelten Zytokinproduktion beschränkten sich hauptsächlich auf Makrophagen und Fibroblasten (#243, #50). Dabei wurde dem Adapterprotein TRIF eine Rolle bei der MyD88-unabhängigen, TLR4-induzierten Zytokinproduktion zugeschrieben [28, 30].

In unserem Labor durchgeführte Genexpressionsstudien in DC einer LPS2-Mausmutante, die eine verkürzte, funktionslose Form des Proteins TRIF exprimiert, zeigten keine veränderte Regulation der TNF- α mRNA Expression nach TLR4-Stimulation [69]. Die Gruppe von Bruce Beutler (La Jolla, USA) hingegen konnte zeigen, dass die TNF- α Proteinproduktion in Thioglykollat-Makrophagen dieser Mausmutante nach TLR4-Ligation reduziert war [28]. Da dies ein Hinweis auf eine differentielle Regulation der TNF- α Produktion in den genannten Zelltypen ist, sollte dieser Aspekt im Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden.

Diskussion

Da die von uns generierten Genexpressions-Daten die TNF- α Induktion lediglich auf mRNA Ebene widerspiegeln, während die Gruppe von Bruce Beutler die Produktion dieses Zytokins auf Proteinebene analysierte, wurde zunächst die TNF- α Proteinproduktion nach LPS Stimulation in Thioglykollat-Makrophagen und GM-CSF generierten Knochenmarks-DC bestimmt.

Die Untersuchung der Proteinexpression von TNF- α in DC wies einen klaren Unterschied zu den eingangs erwähnten Genexpressionsdaten (Microarray) auf. So war sowohl in Thioglykollat-Makrophagen als auch in GM-CSF generierten Knochenmarks-DC eine signifikante TRIF-Abhängigkeit der TNF- α Proteinproduktion nach LPS Stimulation über einen Zeitraum von 8 h zu erkennen. Der Microarray Analyse zufolge war jedoch für DC 3 h nach TLR4 Ligation keine Regulation der TNF- α Produktion auf mRNA-Ebene zu erkennen [69]. Eine nachfolgende Analyse der mRNA in Form einer Kinetik nach LPS Stimulation konnte diesen Befund bestätigen. Expressionslevel der TRIF-mutierten DC zeigten sowohl 1 als auch 2 h nach LPS Zugabe keinen Unterschied zu Wildtypzellen. Ab einem Zeitpunkt von 4 h war sogar eine signifikant höhere Induktion der Expression in den TRIF-mutierten DC zu beobachten. Angesichts der TRIF-Defizienz scheint in DC zu späten Zeitpunkten folglich die Stabilität der RNA erhöht zu sein. In TRIF-mutierten Thioglykollat-Makrophagen hingegen waren die Expressions-Level der TNF- α mRNA bereits 1 h nach Stimulation signifikant reduziert. Auch nach 2 bzw. 4 h Stimulation waren verminderte Level zu erkennen, während nach 6 h dem Wildtyp vergleichbar niedrige Level beobachtet wurden.

Generell war in DC verglichen mit Makrophagen eine geringere Induktion der TNF- α mRNA Expression zu beobachten, wohingegen die TNF- α Proteinproduktion in DC höher als in Makrophagen der Wildtypmäuse war. Zudem ist die Kinetik der TNF- α mRNA Expression beider Zelltypen unterschiedlich. Während in DC die Induktion der TNF mRNA bereits nach 2 h nachlässt, war diese Abnahme in Makrophagen erst zu einem späteren Zeitpunkt zu beobachten. Da in TRIF-mutierten DC die Proteinlevel reduziert waren, die mRNA Produktion jedoch mit dem Wildtyp vergleichbar bzw. sogar erhöht war, wird ein Einfluss von TRIF auf der posttranskriptionellen Ebene vermutet.

Nachdem derzeit zwei TLR4-induzierte TRIF-Signalwege bekannt sind, musste geklärt werden, welcher der beiden Signalwege in die TNF- α Produktion involviert ist. Die Untersuchung von Knochenmarks-Makrophagen und GM-CSF generierten DC aus IFNARI^{-/-} Mäusen zeigte im Vergleich zum Wildtyp unveränderte TNF- α Proteinlevel nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten. Aus diesem Grunde kann der TRIF-Signalweg über IFN- β für die TNF- α Produktion ausgeschlossen werden. Um den Mechanismus aufzuklären, der zu den beobachteten TNF- α Proteinlevel in TRIF-mutierten DC führt, wurde der LPS-induzierte, Typ I IFN-unabhängige Signalweg in diesen Zellen analysiert. Neben der NF- κ B-Aktivierung kommt es über diesen Weg auch zur Aktivierung von MAP Kinasen. Für die MAP Kinase JNK ist beschrieben, dass sie ATF2 und c-Jun

Diskussion

phosphoryliert und dadurch deren Bindung an den TNF- α Promotor induziert [24, 25]). Western Blot-Analysen konnten allerdings zeigen, dass TRIF in DC keinen Einfluss auf diese JNK Aktivierung nach LPS Stimulation hat. Im Gegensatz dazu wurde für Makrophagen eine reduzierte Aktivierung zu späten Zeitpunkten nach LPS Stimulation in TRIF^{-/-} Zellen in der Literatur beschrieben [86]. Der Einfluss von TRIF scheint also in diesem Signalweg zelltyp-spezifisch zu sein.

Die Aktivierung eines weiteren Signalweges, dem des Transkriptionsfaktors NF- κ B, kann anhand der Phosphorylierung und Degradation des I κ B α Proteins untersucht werden. Im TLR4-Signalweg wird I κ B α durch I κ B Kinasen phosphoryliert und dadurch aktiviert. Es folgt eine Polyubiquitinierung, woraus die Degradation des Proteins resultiert. In Folge wird NF- κ B aus dem I κ B-NF- κ B-Komplex freigesetzt und kann in den Kern translozieren. Dort induziert es die Genexpression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine [22, 23].

Für Makrophagen wurde eine Reduktion der I κ B α Aktivierung zu späten Zeitpunkten beschrieben [28]. Die durchgeführten Western Blot Analysen der I κ B α Aktivierung in DC zeigten jedoch im Vergleich zu Wildtypzellen keinerlei Unterschiede im Aktivierungsmuster. Das Adapterprotein TRIF scheint folglich in DC im Gegensatz zu Makrophagen keine Rolle bei der transkriptionellen Aktivierung zu spielen. Angesichts der Diskrepanz zwischen sekretiertem TNF- α Protein und produzierter TNF- α mRNA liegt also in DC entweder eine TRIF-abhängige Regulation der Sekretion oder eine Translationskontrolle durch TRIF vor.

Durch Analyse der intrazellulären Proteinexpression von TNF- α über einen Zeitraum von 20 h nach LPS Stimulation konnte gezeigt werden, dass auch in TRIF mutierten DC die intrazelluläre Proteinmenge gegenüber der von Wildtypzellen signifikant reduziert war. Zusammenfassend kann aus der bereits intrazellulär reduzierten Menge von TNF- α (gemessen im Lysat) in TRIF-mutierten DC ein Einfluss von TRIF auf dessen Sekretion ausgeschlossen werden. Aus diesem Grunde stand in den nachfolgenden Experimenten die Analyse der translationalen Kontrolle von TNF- α im Mittelpunkt.

Für die Regulation der TNF- α Biosynthese sind die in der mRNA enthaltenen AU-reichen Elemente (AREs) von zentraler Bedeutung. An diese Elemente der 3'-untranslatierten Region (UTR) lagern sich mRNA-Bindeproteine wie beispielsweise Tristetraprolin (TTP) an, das eine Degradation der RNA induziert. MK2 reguliert die Stabilisierung und Translation von mRNA durch Phosphorylierung von TTP [76, 87, 88], wodurch dessen Stabilität erhöht wird und zugleich eine Bindung mit 14-3-3 Proteinen vermittelt wird (siehe Abb. 27). Dies hat zur Folge, dass keine Degradation der mRNA erfolgt und sich ein Komplex aus den Initiationsfaktoren eIF4G (eucaryotic translation initiation factor 4G), PABP (polyA-binding protein) und eIF4E (eucaryotic translation initiation factor 4E) an die mRNA anlagern kann, wodurch die Translation eingeleitet wird [89 Brook M. et. al in press]. Die p38 MAP Kinase übt einen Einfluss auf die Translation der mRNA von

Diskussion

Zytokinen aus, indem sie nach Aktivierung im Nukleus einen Komplex mit ihrer Zielkinase MK2 eingeht und diese durch Phosphorylierung aktiviert. Dadurch wird eine Nukleus-Export-Sequenz (NES) von MK2 für Exportproteine zugänglich und es kommt zum Transport des Komplexes ins Zytosol [74, 75]. Hier sind beide Kinasen in die posttranskriptionelle Regulation der Zytokin mRNA involviert [76]. LPS Signale via JNK und p38 MAP Kinase verhindern eine posttranskriptionelle Repression [14]. Da das Aktivierungsmuster von JNK in DC durch TRIF nicht beeinflusst wird (siehe oben), stellt die p38 MAP Kinase ein mögliches Zielprotein für die TRIF-induzierte posttranskriptionelle Regulation von TNF- α dar. Western Blot Analysen zeigten, dass die Aktivierung der p38 MAP Kinase in TRIF-mutierten DC 40 min und 60 min nach LPS Stimulation gegenüber Wildtypzellen signifikant reduziert war. Die p38 Aktivierung erfolgt somit zu diesen Zeitpunkten TRIF-abhängig. Eine verminderte p38 Aktivierung zu späten Zeitpunkten nach LPS Stimulation wurde in Knochenmarks-Makrophagen von TRIF^{-/-} Mäusen gezeigt [86].

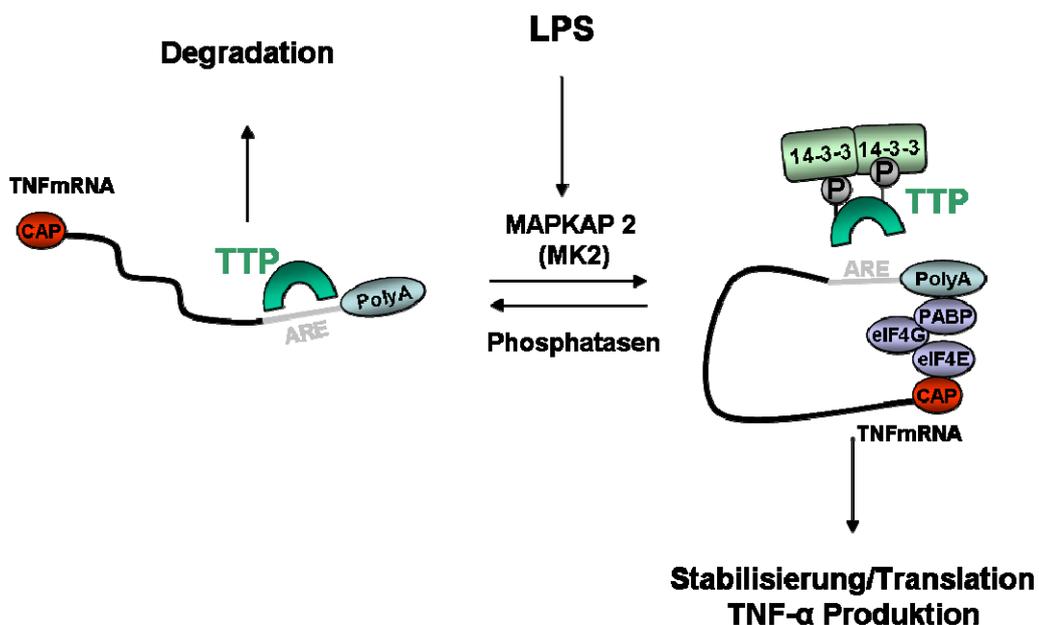


Abb. 27: Einfluss von MAPKAP2 (MK2) auf die TNF- α Biosynthese. Im Zytosol phosphoryliert MK2 TTP (tristetraprolin) wodurch dessen Stabilität erhöht und die Bindung an 14-3-3 Proteine vermittelt wird. Ein Komplex aus Initiationsfaktoren lagert sich an die mRNA an, die dadurch stabilisiert und translatiert wird.

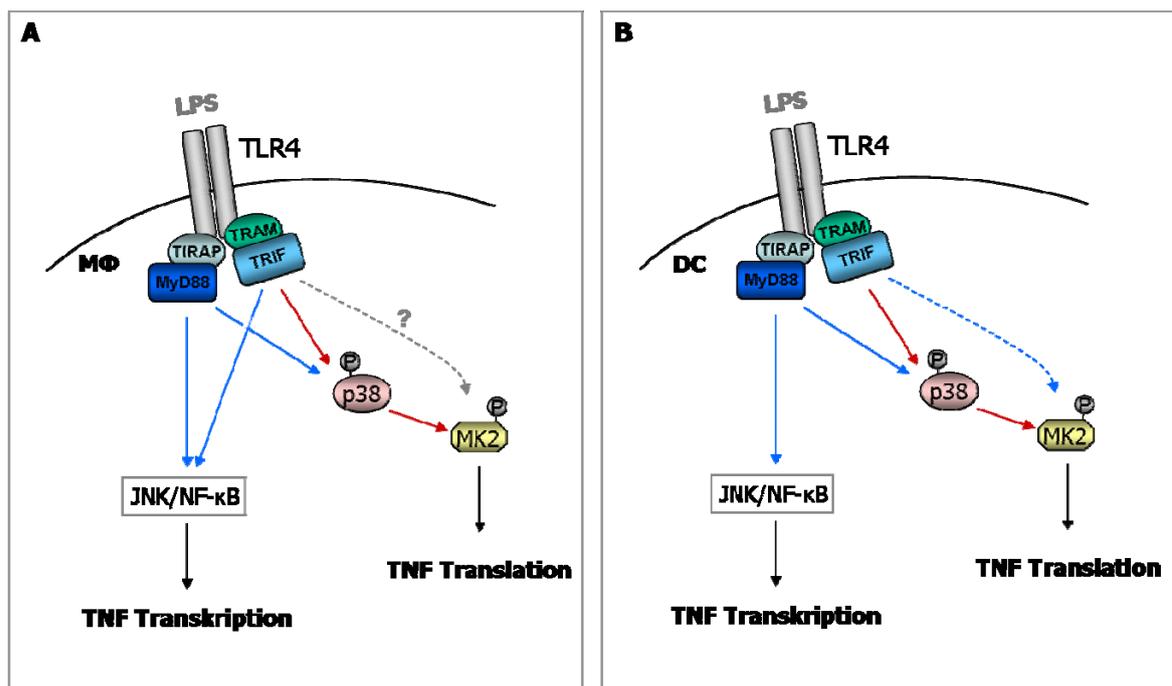
CAP (7-methyl-guanosin-cap), ARE (AU-rich element), PolyA (polyadenylation), PABP (polyA-binding protein), eIF4E (eucaryotic translation initiation factor 4E), eIF4G (eucaryotic translation initiation factor 4G),

Diskussion

MK2 Knockoutmäuse weisen im Vergleich zu Wildtypmäusen nach LPS Stimulation reduzierte TNF- α Proteinlevel jedoch normale TNF- α mRNA-Level auf [76]. Da dieser Phänotyp mit den oben beschriebenen Resultaten aus TRIF-mutierten DC vergleichbar ist, kann für diese Zellen zu späten Zeitpunkten eine TRIF-induzierte MK2-Aktivierung postuliert werden.

Analysen der MK2-Aktivität anhand des Phosphorylierungsstatus zeigten für TRIF-mutierte DC über einen Zeitraum von 90 min nach LPS Stimulation keine Aktivierung dieser Kinase. In Wildtypzellen hingegen kam es bereits 5 min nach LPS Stimulation zu einer Aktivierung von MK2, welche ca. 60 min anhielt und dann auf das Ausgangsniveau zurückging. Folglich ist in DC die Aktivierung von MK2 bereits zu frühen Zeitpunkten abhängig von TRIF.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wird das in Abb. 28 skizzierte Modell vorgeschlagen.



Frühe Phase der Aktivierung

Späte Phase der Aktivierung

Abb. 28: Modell der TLR-induzierten TNF- α Biosynthese. In **A** ist das Aktivierungsmuster nach LPS Stimulation für Makrophagen dargestellt. Es spiegelt den in der Literatur beschriebenen status quo wieder. Das in **B** dargestellte Modell für DC basiert auf den Ergebnissen dieser Arbeit. Mit hellblauen Pfeilen ist die frühe Aktivierungsphase nach LPS Stimulation dargestellt, während rote Pfeile eine späte Aktivierungsphase symbolisieren. M Φ (Makrophage), DC (dendritische Zelle)

Diskussion

Nach LPS Stimulation wird in Makrophagen (Abb. 28A) über die Adapterproteine MyD88 und TRIF die Transkription von TNF- α induziert. In DC hingegen (Abb. 28B) ist diese Aktivierung –wie hier gezeigt wurde– ausschließlich MyD88-abhängig. TRIF scheint hier bei der transkriptionellen Aktivierung keine Rolle zu spielen. Eine mögliche Erklärung hierfür sind Unterschiede in der Rekrutierung der Adapterproteine an die zytoplasmatische Membranseite. Wie bereits unter 1.2. beschrieben werden für die Rekrutierung von MyD88 und TRIF an die Plasmamembran zwei weitere Adapterproteine benötigt. TIRAP bindet dabei über seine Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂)-Domäne an PIP₂ der Membran worauf die Rekrutierung von MyD88 an die Plasmamembran folgt [90]. Das für die TRIF-Rekrutierung an die Membran benötigte Adapterprotein TRAM hingegen verdankt seine Verankerung in der Membran einer N-terminalen Myristylierungsstelle [91]. Ein unterschiedlicher Membranaufbau in Makrophagen und DC könnte somit eine Erklärung für die differentiellen Signalwege bieten.

Die Aktivierung der MAP Kinase p38 erfolgt hingegen in beiden Zelltypen zu frühen Zeitpunkten durch MyD88 und zu späten Zeitpunkten durch TRIF. Dadurch wird zu späten Zeitpunkten der Coexport von p38 und MK2 und die daraus resultierende Translation in Abhängigkeit von TRIF induziert. Angesichts der bereits zu frühen Zeitpunkten nach LPS Stimulation beobachteten Absenz der MK2 Aktivierung in TRIF-mutierten DC wird zudem ein direkter bzw. p38-unabhängiger Einfluss von TRIF auf die MK2-Aktivierung in DC postuliert.

Durch das Fehlen der MK2 vermittelten TTP-Phosphorylierung würde man in TRIF-mutierten Zellen eine erhöhte Degradation der mRNA erwarten. Dies steht allerdings im Widerspruch zu den für DC gezeigten erhöhten TNF- α mRNA-Level zu späten Zeitpunkten nach LPS Stimulation. Dieser Befund kann dadurch erklärt werden, dass MK2 für die Stabilität von TTP benötigt und folglich bei Abwesenheit von TRIF eine Degradation verhindert wird [89]. In TRIF-mutierten Makrophagen wurden zu späten Zeitpunkten keine erhöhten mRNA-Level beobachtet, da hier TRIF bereits zu frühen Zeitpunkten in die transkriptionelle Kontrolle involviert ist und folglich geringere mRNA-Mengen produziert werden.

Die Stabilität von mRNA mit AU-reichen Elementen ist jedoch weitaus komplexer reguliert. Deshalb sind eventuell weitere mRNA-Bindeproteine, die an AREs binden und über p38 oder MK2 reguliert werden, in die TRIF-abhängige Translationskontrolle involviert. So zeigen *in vitro* Studien, dass MK2 das mRNA-Bindeprotein PABP1 phosphorylieren kann, ein Protein, das für die Initiation der Translation benötigt wird [92]. Des Weiteren ist ein direkter Effekt von MK2 auf eIF4E beobachtet worden [71]. Dies unterstreicht, dass noch eine Vielzahl weiterer Untersuchungen notwendig sind um diese komplexe Regulation im Detail aufzuklären.

5.5. Ausblick 2

In weiteren Arbeiten sollte der direkte bzw. p38-unabhängige Einfluss von TRIF auf die MK2-Aktivierung untersucht werden. Einen experimentellen Ansatz hierfür bietet die Inhibition der p38 MAP Kinasen Aktivierung durch den Inhibitor SB203580. Ferner soll die Lokalisation von MK2 und p38 nach LPS Stimulation in TRIF-mutierten DC untersucht werden. Prinzipiell ist durch die verminderte MK2-Aktivierung in TRIF-mutierten DC kein bzw. ein stark verminderter Coexport von MK2 und p38 aus dem Nukleus ins Zytosol zu erwarten. Deshalb sollten beide MAP Kinasen vorwiegend im Nukleus lokalisiert sein, was beispielsweise mit den Methoden der Immunfluoreszenzanalyse sowie durch Zellfraktionierung mit anschließender Western Blot Analyse untersucht werden kann. Um den Mechanismus genauer aufzuklären, ist es zudem von Interesse, den Einfluss von TRIF auf die mRNA-Bindeproteine PABP1 sowie eIF4E zu untersuchen, die an der Initiation der Translation von TNF- α beteiligt sind.

6. Zusammenfassung

Durch seine vielfältigen Abwehrmechanismen schützt das angeborene Immunsystem den Organismus beständig vor den Einflüssen von Pathogenen. Die in die Abwehrreaktion involvierten Zellen kommunizieren dabei hauptsächlich über lösliche Faktoren, wie Zytokine und Chemokine. Die Produktion dieser Mediatoren wird insbesondere über das System der TLR-Rezeptoren induziert, welches hochkonservierte Strukturen der Pathogene erkennt und durch eine intrazelluläre Signaltransduktions-Kaskade die Expression proinflammatorischer Gene induziert. MyD88 stellt in diesem Zusammenhang ein essentielles intrazelluläres Adapterprotein dar.

Um die Relevanz von MyD88 in der angeborenen Immunantwort zelltyp-spezifisch untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *in vivo* Modell etabliert, das eine gezielte Expression dieses Adapterproteins in definierten Zelltypen ermöglicht. Realisiert wurde dies mit Hilfe des Cre/loxP Systems, wobei die konditionale Strategie der „switch-on“-Mutagenese (Anschalten eines Gens) als Basis des Modells gewählt wurde. Durch homologe Rekombination wurde ein Mausstamm generiert, der eine von *loxP*-Erkennungssequenzen flankierte Stopp-Kassette im *MyD88*-Genlocus enthält (MyD88^{stp/stp}). Die Funktionalität der eingeführten Stopp-Kassette konnte durch Untersuchung der Proteinexpression in verschiedenen aus diesem MyD88^{stp/stp} Mausstamm isolierten Zelltypen verifiziert werden. Weiterhin konnte die fehlende MyD88 Expression in GM-CSF generierten dendritischen Zellen aus MyD88^{stp/stp} Mäusen durch das Ausbleiben der IL-6 Produktion nach Stimulation mit TLR-Agonisten bestätigt werden. Der Mausstamm entwickelt sich normal, ist fertil und die Weitergabe des *stp*-Allels folgt den Mendelschen Gesetzen. In weiterführenden Arbeiten kann nun durch Kreuzung dieses Stammes mit Mauslinien, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle zelltyp-spezifischer Promotoren exprimieren, in individuellen Zelltypen eine Reexpression von MyD88 erzeugt werden, während die restlichen Zellen MyD88-defizient bleiben. Auf diese Weise kann die Funktion von MyD88 in definierten Zellpopulationen in der Infektionsabwehr analysiert werden.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde *in vitro* die zelltyp-spezifische Regulation der TNF- α Biosynthese in Makrophagen und dendritischen Zellen eingehend untersucht. Dabei wurde in beiden Zelltypen nach LPS-Stimulation eine signifikante Abhängigkeit der TNF- α Proteinproduktion von TRIF, welches den MyD88-unabhängigen TLR4-Signalweg aktiviert, beobachtet. Während jedoch in Makrophagen die Induktion der mRNA von TNF- α über einen Zeitraum von 8 h ebenfalls abhängig von TRIF erfolgte, konnte für dendritische Zellen nach LPS-Stimulation kein Einfluss von TRIF auf die mRNA Synthese von TNF- α nachgewiesen werden. Durch Analysen der NF- κ B- und JNK-Aktivierung kann in dendritischen Zellen eine Rolle von TRIF bei der Aktivierung der Transkription von TNF- α

Zusammenfassung

ausgeschlossen werden. Untersuchungen der MAP Kinasen, die für die posttranskriptionelle Regulation von zentraler Bedeutung sind, zeigten eine signifikante TRIF-abhängige Aktivierung. So wird die MAP Kinase p38 dabei zu späten Zeitpunkten nach LPS-Stimulation durch TRIF aktiviert, während die Kinase MK2 bereits zu frühen Zeitpunkten TRIF-abhängig ist. MK2 ist folglich in die posttranskriptionelle Regulation von TNF- α involviert. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit kann der Schluss gezogen werden, dass die Produktion von TNF- α in DC lediglich auf posttranskriptioneller Ebene durch TRIF reguliert wird, während TRIF in Makrophagen zusätzlich an der transkriptionellen Regulation beteiligt ist. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals die Rolle des Adapterproteins TRIF in der posttranskriptionellen Regulation von TNF- α differenziert beschrieben werden.

Abbildungsverzeichnis

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Pathogen-Erkennungs-Systeme der angeborenen Immunantwort	S. 3
Abb. 2:	Übersicht über TLR-Rezeptoren und ihre Liganden	S. 5
Abb. 3:	Schematische Übersicht über Signalwege der angeborenen Immunantwort	S. 8
Abb. 4:	TLR-induzierte Makrophagen-Mediatoren in der Pathogenese der Sepsis	S. 11
Abb. 5:	Blot-Aufbau für den Southern Blot	S. 38
Abb. 6:	Schematische Darstellung des pBSlacZTK-Inserts	S. 50
Abb. 7:	Targetingstrategie für die Generierung des MyD88 ^{stp} -Allels	S. 52
Abb. 8:	Hybridisierung der Screening-PCR	S. 53
Abb. 9:	Strategie für die Southern Blot Analyse	S. 54
Abb. 10:	Southern Blot Analyse homolog rekombinierter ES-Zell-Klone	S. 55
Abb. 11:	Strategie für die <i>in vitro</i> Cre-Rekombination	S. 56
Abb. 12:	Southern Blot Analyse der Cre-rekombinierten ES-Zell-Klone	S. 57
Abb. 13:	Schematische Darstellung der Generierung chimärer Mäuse aus homolog rekombinierten ES-Zellen durch Blastozysteninjektion.	S. 59
Abb. 14:	Verpaarungsschema	S. 60
Abb. 15:	Southern Blot Analyse der Schwanz-DNA der generierten Mäuse	S. 61
Abb. 16:	Expression von MyD88 in MyD88 ^{stp/stp} Mäusen	S. 62
Abb. 17:	Zytokinproduktion nach Stimulation mit TLR Agonisten	S. 63
Abb. 18:	TNF- α Produktion in Thioglykollat-Makrophagen versus Knochenmarks-DC	S. 65
Abb. 19:	TNF- α mRNA Produktion in Thioglykollat-Makrophagen versus Knochenmarks-DC	S. 66
Abb. 20:	TNF- α Produktion in IFNARI ^{-/-} Mäusen	S. 67
Abb. 21:	Analyse der JNK-Aktivierung	S. 68
Abb. 22:	Analyse der I κ B α -Aktivierung	S. 69
Abb. 23:	TNF- α Protein: Lysat versus Überstand	S. 70
Abb. 24:	Aktivierung der p38 MAP Kinase	S. 71
Abb. 25:	Modell der MK2-Aktivierung	S. 72
Abb. 26:	MAPKAP Kinase 2 (MK2)-Aktivierung	S. 73
Abb. 27:	Einfluss von MAPKAPK2 (MK2) auf die TNF- α Biosynthese	S. 81
Abb. 28:	Modell der TLR-induzierten TNF- α Biosynthese	S. 82

Tabellenverzeichnis

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Erstantikörper	S. 20
Tab. 2:	Zweitantikörper	S. 21
Tab. 3:	Isotypkontrollen	S. 21
Tab. 4:	Oligonukleotide zur Generierung des Targetvektors	S. 22
Tab. 5:	Oligonukleotide zur Generierung der Sonden für die Southern Blot-Analyse	S. 23
Tab. 6:	Oligonukleotide zum Screening der ES-Zell-Klone und Genotypisierung der MyD88 ^{stp/stp} Mäuse	S. 23
Tab. 7:	Oligonukleotide für die RT-PCR	S. 23
Tab. 8:	Klonierungsvektoren/Plasmide	S. 24
Tab. 9:	Medien für die Zellkultur	S. 27
Tab. 10:	Bakterien	S. 28
Tab. 11:	Zelllinien	S. 28
Tab. 12:	Versuchstiere	S. 29
Tab. 13:	PCR-Programme	S. 35

Abkürzungsverzeichnis

9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
antis.	antisense
APC	Allophycoerythrin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
cDC	conventional dendritic cell(s)
cDNA	copy DNA
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CpG2216	cytosine-guanosine dinucleotides 2216
Cre	causes recombination
°C	Grad Celsius
d	day
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)
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
F2	filial generation 2
FCS	fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
h	hour
H ₂ O _{dd}	didestilliertes Wasser
HCG	human chorionic gonadotropin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM-1	cell adhesion molecule 1

Abkürzungsverzeichnis

IL	Interleukin
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilo Dalton
LB	lysogeny broth
LBP	LPS-bindendes Protein
LIF	leukemia inhibitory factor
loxP	locus X-ing over P1 phage
M	Mol
mA	Milliampere
MALP	macrophage-activating lipopeptide
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MEM	modified eagle medium
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
ND	nicht detektierbar
neo	Neomycin Phosphotransferase
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Pam ₃ Cys	N-palmitoyl-(s)-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(RS)-propyl] cysteine
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pDC	plasmacytoid dendritic cell(s)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin chlorophyll protein
pg	Pikogramm
PMSG	pregnant mare serum gonadotropin
POX	Peroxidase
RIPA	Radion-Immunoprecipitation assay
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institut Medium
RT	Raumtemperatur
S.O.C.	super optimal broth with catabolite repression
SDS	Sodium-dodecylsulfat
SEM	standard error of measurement

Abkürzungsverzeichnis

SNET	SDS/NaCl/EDTA/Tris
SPF	Spezifisch pathogen frei
SSC	Sodiumchlorid-sodiumcitrate
stp	Stopp
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TBST	Tris buffered saline Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNE	Tris/NaCl/EDTA
TNP	Trinitrophenol
u	unit
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultra Violett
μ F	Mikrofarad
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VCAM-1	vascular adhesion molecule 1
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
β -ME	β -Mercaptoethanol

Literatur

1. **Horner, C, Bouchon, A., Bierhaus, A., Nawroth, P. P., Martin, E., Bardenheuer, H. J., and Weigand, M. A.,** [Role of the innate immune response in sepsis]. *Anaesthesist* 2004. **53**: 10-28.
2. **McGeer, E G, Klegeris, A., and McGeer, P. L.,** Inflammation, the complement system and the diseases of aging. *Neurobiol.Aging* 2005. **26 Suppl 1**: 94-97.
3. **Akira, S, Uematsu, S., and Takeuchi, O.,** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006. **124**: 783-801.
4. **Medzhitov, R and Janeway, C., Jr.,** Innate immunity. *N.Engl.J.Med.* 2000. **343**: 338-344.
5. **Muller-Eberhard, H J and Gotze, O.,** C3 proactivator convertase and its mode of action. *J.Exp.Med.* 1972. **135**: 1003-1008.
6. **Verhoef, J,** The phagocytic process and the role of complement in host defense. *J.Chemother.* 1991. **3 Suppl 1**: 93-97.
7. **Medzhitov, R, Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr.,** A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997. **388**: 394-397.
8. **Rock, F L, Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., and Bazan, J. F.,** A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998. **95**: 588-593.
9. **Lemaitre, B,** The road to Toll. *Nat.Rev.Immunol.* 2004. **4**: 521-527.
10. **Bowie, A and O'Neill, L. A.,** The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J.Leukoc.Biol.* 2000. **67**: 508-514.
11. **Slack, J L, Schooley, K., Bonnert, T. P., Mitcham, J. L., Qwarnstrom, E. E., Sims, J. E., and Dower, S. K.,** Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J.Biol.Chem.* 2000. **275**: 4670-4678.
12. **Hopkins, P A and Sriskandan, S.,** Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin.Exp.Immunol.* 2005. **140**: 395-407.
13. **Inohara, Chamailard, McDonald, C., and Nunez, G.,** NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu.Rev.Biochem.* 2005. **74**: 355-383.
14. **Kontoyiannis, D, Pasparakis, M., Pizarro, T. T., Cominelli, F., and Kollias, G.,** Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements:

Literatur

- implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity*. 1999. **10**: 387-398.
15. **Laudanna, C, Kim, J. Y., Constantin, G., and Butcher, E.,** Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol.Rev.* 2002. **186**: 37-46.
 16. **Dinarello, C A,** Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997. **112**: 321S-329S.
 17. **Fan, J and Malik, A. B.,** Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. *Nat.Med.* 2003. **9**: 315-321.
 18. **Dransfield, I, Stocks, S. C., and Haslett, C.,** Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis. *Blood* 1995. **85**: 3264-3273.
 19. **Hotchkiss, R S and Karl, I. E.,** The pathophysiology and treatment of sepsis. *N.Engl.J.Med.* 2003. **348**: 138-150.
 20. **Takeda, K and Akira, S.,** Toll-like receptors in innate immunity. *Int.Immunol.* 2005. **17**: 1-14.
 21. **O'Neill, L A and Bowie, A. G.,** The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat.Rev.Immunol.* 2007. **7**: 353-364.
 22. **Wang, C, Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J., and Chen, Z. J.,** TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001. **412**: 346-351.
 23. **Chen, Z J,** Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat.Cell Biol.* 2005. **7**: 758-765.
 24. **Holtmann, H, Enninga, J., Kalble, S., Thiefes, A., Dorrie, A., Broemer, M., Winzen, R., Wilhelm, A., Ninomiya-Tsuji, J. , Matsumoto, K., Resch, K., and Kracht, M.,** The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation. *J.Biol.Chem.* 2001. **276**: 3508-3516.
 25. **Diaz, B and Lopez-Berestein, G.,** A distinct element involved in lipopolysaccharide activation of the tumor necrosis factor-alpha promoter in monocytes. *J.Interferon Cytokine Res.* 2000. **20**: 741-748.
 26. **Kawai, T, Sato, S., Ishii, K. J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J., Uematsu, S., Takeuchi, O., and Akira, S.,** Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat.Immunol.* 2004. **5**: 1061-1068.

Literatur

27. **Honda, K, Yanai, H., Mizutani, T., Negishi, H., Shimada, N., Suzuki, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yeh, W. C., and Taniguchi, T.,** Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004. **101**: 15416-15421.
28. **Hoebe, K, Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabet, K., Kim, S. O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Han, J., and Beutler, B.,** Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 2003. **424**: 743-748.
29. **Fitzgerald, K A, Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M., and Golenbock, D. T.,** LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J.Exp.Med.* 2003. **198**: 1043-1055.
30. **Yamamoto, M, Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S.,** Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003. **301**: 640-643.
31. **Fitzgerald, K A, McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M., and Maniatis, T.,** IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat.Immunol.* 2003. **4**: 491-496.
32. **Meylan, E, Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M., and Tschopp, J.,** RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat.Immunol.* 2004. **5**: 503-507.
33. **Hacker, H, Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L. C., Wang, G. G., Kamps, M. P., Raz, E., Wagner, H., Hacker, G., Mann, M., and Karin, M.,** Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 2006. **439**: 204-207.
34. **Poltorak, A, He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B.,** Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998. **282**: 2085-2088.
35. **Shimazu, R, Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M.,** MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J.Exp.Med.* 1999. **189**: 1777-1782.
36. **Carty, M, Goodbody, R., Schroder, M., Stack, J., Moynagh, P. N., and Bowie, A. G.,** The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat.Immunol.* 2006. **7**: 1074-1081.
37. **Gantner, B N, Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S., and Underhill, D. M.,** Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J.Exp.Med.* 2003. **197**: 1107-1117.

Literatur

38. **Rogers, N C, Slack, E. C., Edwards, A. D., Nolte, M. A., Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, D. L., Gordon, S., Tybulewicz, V. L., Brown, G. D., and Reis e Sousa,** Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity*. 2005. **22**: 507-517.
39. **Brown, G D, Taylor, P. R., Reid, D. M., Willment, J. A., Williams, D. L., Martinez-Pomares, L., Wong, S. Y., and Gordon, S.,** Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J.Exp.Med.* 2002. **196**: 407-412.
40. **Taylor, P R, Brown, G. D., Reid, D. M., Willment, J. A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., and Wong, S. Y.,** The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J.Immunol.* 2002. **169**: 3876-3882.
41. **Reid, D M, Montoya, M., Taylor, P. R., Borrow, P., Gordon, S., Brown, G. D., and Wong, S. Y.,** Expression of the beta-glucan receptor, Dectin-1, on murine leukocytes in situ correlates with its function in pathogen recognition and reveals potential roles in leukocyte interactions. *J.Leukoc.Biol.* 2004. **76**: 86-94.
42. **Underhill, D M, Rossnagle, E., Lowell, C. A., and Simmons, R. M.,** Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* 2005. **106**: 2543-2550.
43. **Gross, O, Gewies, A., Finger, K., Schafer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., Forster, I., and Ruland, J.,** Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 2006. **442**: 651-656.
44. **Martinon, F, Burns, K., and Tschopp, J.,** The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol.Cell* 2002. **10**: 417-426.
45. **Hornung, V, Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M., Endres, S., and Hartmann, G.,** 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006. **314**: 994-997.
46. **Creagh, E M and O'Neill, L. A.,** TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol.* 2006. **27**: 352-357.
47. **Kawai, T, Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O., and Akira, S.,** IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat.Immunol.* 2005. **6**: 981-988.
48. **Seth, R B, Sun, L., Ea, C. K., and Chen, Z. J.,** Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005. **122**: 669-682.
49. **Astiz, M E and Rackow, E. C.,** Septic shock. *Lancet* 1998. **351**: 1501-1505.

Literatur

50. **Bone, R C, Sibbald, W. J., and Sprung, C. L.,** The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992. **101**: 1481-1483.
51. **Cohen, J,** The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002. **420**: 885-891.
52. **Weighardt, H, Kaiser-Moore, S., Vabulas, R. M., Kirschning, C. J., Wagner, H., and Holzmann, B.,** Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 deficiency improves resistance against sepsis caused by polymicrobial infection. *J.Immunol.* 2002. **169**: 2823-2827.
53. **Iwasaki, A and Medzhitov, R.,** Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* 2004. **5**: 987-995.
54. **Underhill, D M, Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M., and Aderem, A.,** The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999. **401**: 811-815.
55. **Akashi, S, Shimazu, R., Ogata, H., Nagai, Y., Takeda, K., Kimoto, M., and Miyake, K.,** Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J.Immunol.* 2000. **164**: 3471-3475.
56. **Hornef, M W, Normark, B. H., Vandewalle, A., and Normark, S.,** Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J.Exp.Med.* 2003. **198**: 1225-1235.
57. **Kato, H, Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S.,** Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity.* 2005. **23**: 19-28.
58. **Honda, K, Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., and Taniguchi, T.,** Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* 2005. **434**: 1035-1040.
59. **Mu, M M, Koide, N., Hassan, F., Islam, S., Sugiyama, T., Ito, H., Mori, I., Yoshida, T., and Yokochi, T.,** A role of mitogen and stress-activated protein kinase 1/2 in survival of lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 2005. **43**: 277-286.
60. **Janssens, S, Burns, K., Tschopp, J., and Beyaert, R.,** Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr.Biol.* 2002. **12**: 467-471.
61. **Tabeta, K, Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., and Beutler, B.,** Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004. **101**: 3516-3521.

Literatur

62. **Weiss, D S, Raupach, B., Takeda, K., Akira, S., and Zychlinsky, A.,** Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J.Immunol.* 2004. **172**: 4463-4469.
63. **Bafica, A, Scanga, C. A., Feng, C. G., Leifer, C., Cheever, A., and Sher, A.,** TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *J.Exp.Med.* 2005. **202**: 1715-1724.
64. **Bafica, A, Santiago, H. C., Goldszmid, R., Ropert, C., Gazzinelli, R. T., and Sher, A.,** Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection. *J.Immunol.* 2006. **177**: 3515-3519.
65. **Koga, R, Hamano, S., Kuwata, H., Atarashi, K., Ogawa, M., Hisaeda, H., Yamamoto, M., Akira, S., Himeno, K., Matsumoto, M., and Takeda, K.,** TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against Trypanosoma cruzi. *J.Immunol.* 2006. **177**: 7059-7066.
66. **Trinchieri, G and Sher, A.,** Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat.Rev.Immunol.* 2007. **7**: 179-190.
67. **Schilling, J D, Martin, S. M., Hung, C. S., Lorenz, R. G., and Hultgren, S. J.,** Toll-like receptor 4 on stromal and hematopoietic cells mediates innate resistance to uropathogenic Escherichia coli. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003. **100**: 4203-4208.
68. **Andonegui, G, Bonder, C. S., Green, F., Mullaly, S. C., Zbytniuk, L., Raharjo, E., and Kubes, P.,** Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J.Clin.Invest* 2003. **111**: 1011-1020.
69. **Weighardt, H, Jusek, G., Mages, J., Lang, R., Hoebe, K., Beutler, B., and Holzmann, B.,** Identification of a TLR4- and TRIF-dependent activation program of dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 2004. **34**: 558-564.
70. **Kawai, T, Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S.,** Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* 1999. **11**: 115-122.
71. **Gaestel, M,** MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2006. **7**: 120-130.
72. **Miyazawa, K, Backstrom, G., Leppanen, O., Persson, C., Wernstedt, C., Hellman, U., Heldin, C. H., and Ostman, A.,** Role of immunoglobulin-like domains 2-4 of the platelet-derived growth factor alpha-receptor in ligand-receptor complex assembly. *J.Biol.Chem.* 1998. **273**: 25495-25502.
73. **Wang, S W, Pawlowski, J., Wathen, S. T., Kinney, S. D., Lichenstein, H. S., and Manthey, C. L.,** Cytokine mRNA decay is accelerated by an inhibitor of p38-mitogen-activated protein kinase. *Inflamm.Res.* 1999. **48**: 533-538.

Literatur

74. **Engel, K, Kotlyarov, A., and Gaestel, M.,** Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *EMBO J.* 1998. **17**: 3363-3371.
75. **Ben Levy, R, Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H. F., and Marshall, C. J.,** Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr.Biol.* 1998. **8**: 1049-1057.
76. **Kotlyarov, A, Neininger, A., Schubert, C., Eckert, R., Birchmeier, C., Volk, H. D., and Gaestel, M.,** MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat.Cell Biol.* 1999. **1**: 94-97.
77. **Adachi, O, Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S.,** Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity.* 1998. **9**: 143-150.
78. **Pfeffer, K and Mak, T. W.,** Lymphocyte ontogeny and activation in gene targeted mutant mice. *Annu.Rev.Immunol.* 1994. **12**: 367-411.
79. **Sato, S, Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S. ,** Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* 2005. **6**: 1087-1095.
80. **Clausen, B E, Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Forster, I.,** Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* 1999. **8**: 265-277.
81. **Seki, E, Tsutsui, H., Tsuji, N. M., Hayashi, N., Adachi, K., Nakano, H., Futatsugi-Yumikura, S., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S., Fujimoto, J., and Nakanishi, K.,** Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes* in mice. *J.Immunol.* 2002. **169**: 3863-3868.
82. **Kuhn, R, Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Muller, W.,** Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993. **75**: 263-274.
83. **Rakoff-Nahoum, S, Hao, L., and Medzhitov, R.,** Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity.* 2006. **25**: 319-329.
84. **Koni, P A, Joshi, S. K., Temann, U. A., Olson, D., Burkly, L., and Flavell, R. A.,** Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow. *J.Exp.Med.* 2001. **193**: 741-754.
85. **Forde, A, Constien, R., Grone, H. J., Hammerling, G., and Arnold, B.,** Temporal Cre-mediated recombination exclusively in endothelial cells using Tie2 regulatory elements. *Genesis.* 2002. **33**: 191-197.

Literatur

86. **Jeyaseelan, S, Young, S. K., Fessler, M. B., Liu, Y., Malcolm, K. C., Yamamoto, M., Akira, S., and Worthen, G. S.,** Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF)-mediated signaling contributes to innate immune responses in the lung during Escherichia coli pneumonia. *J.Immunol.* 2007. **178**: 3153-3160.

87. **Chrestensen, C A, Schroeder, M. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Pelo, J. W., Worthington, M. T., and Sturgill, T. W.,** MAPKAP kinase 2 phosphorylates tristetraprolin on in vivo sites including Ser178, a site required for 14-3-3 binding. *J.Biol.Chem.* 2004. **279**: 10176-10184.

88. **Stoecklin, G, Stubbs, T., Kedersha, N., Wax, S., Rigby, W. F., Blackwell, T. K., and Anderson, P.,** MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *EMBO J.* 2004. **23**: 1313-1324.

89. **Hitti, E, Iakovleva, T., Brook, M., Deppenmeier, S., Gruber, A. D., Radzioch, D., Clark, A. R., Blackshear, P. J., Kotlyarov, A., and Gaestel, M.,** Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Mol.Cell Biol.* 2006. **26**: 2399-2407.

90. **Kagan, J C and Medzhitov, R.,** Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 2006. **125**: 943-955.

91. **Rowe, D C, McGettrick, A. F., Latz, E., Monks, B. G., Gay, N. J., Yamamoto, M., Akira, S., O'Neill, L. A., Fitzgerald, K. A., and Golenbock, D. T.,** The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006. **103**: 6299-6304.

92. **Bollig, F, Winzen, R., Gaestel, M., Kostka, S., Resch, K., and Holtmann, H.,** Affinity purification of ARE-binding proteins identifies polyA-binding protein 1 as a potential substrate in MK2-induced mRNA stabilization. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2003. **301**: 665-670.

10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Holzmann für die Bereitstellung des Themas, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die engagierte Betreuung bedanken.

Herrn Prof. Dr. M. Schemann danke ich für die Betreuung der Arbeit von Seiten der Fakultät.

Mein Dank gilt auch Heike Weighardt für ihre Hilfestellung. Vor allem aber auch dafür, dass sie mich motiviert hat an Kongressen teilzunehmen.

Klaus-Peter Janßen möchte ich für sein Interesse an meiner Arbeit und die bereitwillige Diskussion bei auftretenden Problemen danken.

Marit Harzenetter spreche ich meinen Dank aus für die Einarbeitung in den ersten Tagen, Moni Semmrich und Heike Weighardt für die Einweisung in die ES-Zellkultur.

Bei der Gruppe Janßen möchte ich mich für die freundliche Aufnahme ins „Paradies“ bedanken, in dem ich so manch heiteren Moment erleben durfte und bei Tanja Scheikl, Berni Bartsch, Moni und Romy Laugks für einige unvergessliche Augenblicke außerhalb des Paradieses.

Sandra Beer gilt mein Dank für die Bereitstellung des Ausgangsvektors, die Mikroinjektionen und für ihre herzliche Hilfsbereitschaft, die sogar Gesangsauftritte vor Herrn Prof. Wagner eingeschlossen hat.

Für die gewissenhafte Durchsicht meiner Arbeit bedanke ich mich bei Georg Dünstl, Felicitas Altmayr, Klaus-Peter Janßen, Melanie Laschinger, Schorschi und Melanie Martini.

Dr. med. C. Pröbstl möchte ich meinen Dank für sein Ministipendium aussprechen.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die moralische Unterstützung und das Verständnis insbesondere während der Phase der ES-Zellkultur.

Zum Schluß danke ich der gesamten Arbeitsgruppe für die angenehme Atmosphäre und die Hilfe im Laboralltag. Besonderer Dank geht dabei an Melanie Martini, Felicitas Altmayr und Dani Mayr.