

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel)

Die Rolle von Bcl10 und Malt1 in dendritischen Zellen

Katrin Marie Finger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. J. Ruland
2. Univ.-Prof. Dr. J. G. Duyster

Die Dissertation wurde am 09.03.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.09.2009 angenommen.

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	5
1 Einleitung	7
1.1 Das Immunsystem	7
1.1.1 Die zellulären Bestandteile des Immunsystems	9
1.1.1.1 Charakterisierung dendritischer Zellen	9
1.1.2 Mustererkennungsrezeptoren	12
1.1.2.1 Die Familie der Toll-like Rezeptoren.....	12
1.1.2.2 Die TLR/IL-1R-Signalkaskade	14
1.1.2.3 Der Dectin-1 Rezeptor	16
1.1.2.4 Der Dectin-1-vermittelte intrazelluläre Signalweg	17
1.1.3 Bcl10 und Malt1 als Schlüsselproteine der adaptiven Immunantwort.....	18
1.1.3.1 Charakterisierung von Bcl10.....	18
1.1.3.2 Charakterisierung von Malt1	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Bestimmung des Mausgenotyps mittels Polymerasekettenreaktion	21
2.2 Kultivierung dendritischer Zellen aus Knochenmark	22
2.3 Färbung der BM-DCs zur Analyse mittels Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)	23
2.4 Analyse der Zytokinsekretion mittels Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	23
2.5 Anfertigung von Immunfluoreszenzen.....	24
3 Ergebnisse	25
3.1 Normale Differenzierung und Funktionalität von BM-DCs <i>in vitro</i>	25
3.2 Bcl10 und Malt1 als Teil des Dectin-1-vermittelten Signalweges.....	26
3.3 Aktivierung von NF- κ B über Bcl10 und Malt1	27
3.4 Bestätigung der Resultate mit <i>Candida albicans</i>	28
4 Diskussion	30
4.1 Bcl10 und Malt1 sind für die Differenzierung dendritischer Zellen entbehrlich.....	30
4.2 Bcl10 und Malt1 als Teil der angeborenen Immunantwort.....	30
4.3 Bcl10 und Malt1 als Signalmoleküle bei fungalen Infektionen.....	33
4.4 Potentielle Beteiligung von Bcl10 und Malt1 in der Signaltransduktion von weiteren ITAM-Rezeptoren	34

5	Zusammenfassung und Ausblick	36
	Literaturverzeichnis.....	38
	Verzeichnis der Abbildungen.....	46
	Verzeichnis der Tabellen.....	46
	Lebenslauf.....	47
	Danksagung	48

Verzeichnis der Abkürzungen

Ak	Antikörper
B	B-Zellen
Bcl10	B cell lymphoma 10
BM-DC	bone marrow-derived dendritic cell
CARD	caspase recruitment domain, Caspase-rekrutierenden Domäne
CpG	Cytosin-Guanin Dinukleotid
DC	dendritische Zelle
DD	death domain, Todesdomäne
Dectin-1	dendritic-cell-associated C-type lectin-1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ELISA	Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay
Erk	extracellular signal-regulated kinases, extrazellulär Signal-regulierten Kinasen
FACS	Fluoreszenz-Activating Cell Sorting
FCS	Fetal Bovine Serum, fetales Kälberserum
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I κ B	inhibitor of nuclear factor- κ B
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IRF3	interferon-regulatory factor 3
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
Jnk	Jun N-terminale kinases, Jun N-terminale Kinasen
kb	Kilobase
LRRs	leucine-rich repeats, Leucin-reiche Wiederholungsmotive
LPS	Lipopolysaccharid
Malt	mucosa-associated lymphoid tissues, Mukosa-assoziertes lymphatisches Gewebe
Malt1	mucosa-associated lymphoid tissue 1
MAPK	mitogen-activated protein kinase, Mitogen-aktivierende Proteinkinase

MHC II	major histocompatibility complex class II, Klasse II Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
MP	Makrophage
MyD88	myeloid differentiation primary-response protein 88
Na-Acid	Natriumacid
NF- κ B	nuclear factor- κ B, nukleärer Faktor κ B
NK Zellen	natürliche Killerzellen
PAMP	pathogen-associated molecular pattern, Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PGN	Peptidoglykan
PRR	pattern-recognition receptor, Mustererkennungsrezeptor
RBC	red blood cell, Erythrozyt
RT	Raumtemperatur
ssRNA	single-stranded RNA, einzelsträngige Ribonukleinsäure
SYK	spleen tyrosine kinase
T	T-Zellen
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGF- β	transforming growth factor- β , transformierender Transkriptionsfaktor β
TIR	Toll/IL-1R
TIRAP	TIR domain-containing adapter protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TLR/IL-1R	Toll-like Rezeptor/Interleukin-1 Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAM	Trif-related adapter molecule
Trif	TIR domain-containing adapter inducing IFN β
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem wird in zwei grundsätzlich sehr verschieden organisierte Systeme unterteilt: das angeborene und das erworbene Immunsystem (Hoffmann et al., 1999). Das angeborene Immunsystem ist der entwicklungs geschichtlich ältere Teil der Verteidigungsmechanismen gegen Pathogene. Dringen Pathogene in den Organismus ein, treffen diese zunächst auf die Verteidigungsmechanismen des angeborenen Immunsystems, welches die erste Verteidigungslinie gegen Pathogene darstellt. Der Hauptunterschied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem besteht in den Rezeptortypen, die von beiden Immunsystemen zur Erkennung von Pathogenen verwendet werden (Medzhitov, 2007). Die Reaktion des angeborenen Immunsystems auf Pathogene wird durch Mustererkennungsrezeptoren (pattern-recognition receptors, PRRs) ausgelöst (Janeway, 1989). Aufgrund dieser Keimbahn-kodierten PRRs, die auf der Zelloberfläche und in intrazellulären Kompartimenten exprimiert oder in den Blutstrom und die Lymphe sezerniert werden (Medzhitov und Janeway, 1997), ist das angeborenen Immunsystem fähig, zwischen fremden und körpereigenen Antigenen zu unterscheiden und deren Bekämpfung zu veranlassen oder zu unterdrücken (Medzhitov und Janeway, 2002). Erkannt werden Pathogene anhand konservierter und invarianter Erkennungsstrukturen, welche als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) bezeichnet werden (Janeway, 1989). Aufgrund drei wichtiger Eigenschaften eignen sich PAMPs besonders zur Induktion einer angeborenen Immunantwort: PAMPs sind invariante Strukturen innerhalb einer Mikroorganismenklasse, sie sind Zellprodukte, die allein den Mikroorganismen zugeordnet werden können, was die Unterscheidung zwischen körpereigenen und -fremden Molekülen zulässt, und sie haben eine für die mikrobielle Physiologie essenzielle Rolle, wodurch die Fähigkeit der Mikroorganismen, der angeborenen Immunerkennung durch evolutionäre Adaption zu entkommen, limitiert wird (Janeway und Medzhitov, 1998). Bakterielle PAMPs sind häufig Zellwandbestandteile, zum Beispiel Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane (PGN), Lipoteichonsäure und Lipoproteine (Aliprantis et al., 1999; Brightbill et al., 1999; Muzio et al., 1998). Ein wichtiges fungales PAMP ist β -Glukan, eine Zellwandkomponente von Pilzen. Im Gegensatz zu diesen PAMPs werden virale Komponenten innerhalb der Wirtszelle repliziert, weshalb das angeborene Immunsystem Viren hauptsächlich über deren Nukleinsäuren erkennt. Die Erkennung dieser

verschiedenen Strukturen durch die Zellen des angeborenen Immunsystems kann die Präsenz von Mikroorganismen signalisieren (Medzhitov, 2007).

Zu den Zellen, die PRRs exprimieren und damit PAMPs erkennen, zählen Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, natürliche Killerzellen (natural killer cells, NK Zellen) und dendritische Zellen (Aderem und Underhill, 1999). Diese Zellen werden durch Pathogene aktiviert und differenzieren sich zu Effektorzellen, deren primäre Aufgabe die Eliminierung der Pathogene ist. Gelingt dem angeborenen Immunsystem dies nicht, ist die Aktivierung des erworbenen Immunsystems notwendig. Dies geschieht unter anderem durch die Expression co-stimulatorischer Moleküle (zum Beispiel CD80 und CD86) auf Antigen-präsentierenden Zellen, deren Hauptvertreter dendritische Zellen sind (Fearon und Locksley, 1996; Janeway, 1989).

Das erworbene Immunsystem wird vor allem von T- und B-Lymphozyten gebildet. Diese tragen Antigenrezeptoren, die durch die somatische Neuordnung aus einem Pool von Rezeptorsegmenten entstehen. Dies ermöglicht eine große Rezeptorvariabilität in der adaptiven Immunerkennung (Agrawal et al., 1998) mit der Fähigkeit, sich an Antigene zu erinnern und zu adaptieren. Die Fähigkeit, zwischen körpereigenen und –fremden Rezeptorliganden zu unterscheiden, geht jedoch verloren (Janeway, 1992). Die Aktivierung des erworbenen Immunsystems benötigt neben Signalen des Antigenrezeptors auch co-stimulatorische Moleküle und Signale von Antigen-präsentierenden und anderen immunkompetenten Zellen, die nach Antigenerkennung lösliche Botenstoffe, Zytokine und Chemokine, produzieren und sezernieren (Aderem und Underhill, 1999).

Bei Zytokinen unterscheidet man zwischen pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen. Die zentralen Zytokine inflammatorischer Prozesse sind Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor (tumor necrosis factor, TNF), die die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose regulieren und die Produktion von Sekundärzytokinen induzieren (Chen und Goeddel, 2002). Hauptsächlich wird TNF von Makrophagen gebildet, in geringerem Umfang auch von Mastzellen, lymphatischen Zellen und Endothelzellen (Wajant et al., 2003). Ein weiteres inflammatorisches Zytokin ist Interleukin-6 (IL-6), das von T-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen, Fibroblasten und Endothelzellen produziert wird. IL-6 induziert die Differenzierung der B-Zellen zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen. Interleukin-10 (IL-10) dagegen ist ein immunsuppressives Zytokin, das unter anderem von regulatorische T-Zellen und dendritischen Zellen gebildet wird. IL-10 inhibiert die Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) durch Th1-Zellen sowie die Schlüsselzytokine der Entzündungsreaktion TNF- α und IL-1 und die Produktion von IL-6.

Weiterhin vermittelt IL-10 immunsuppressive Effekte, indem es die Antigenpräsentation unterbindet und regulatorische CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen aktiviert (Aderem und Underhill, 1999). Bei Interleukin-2 (IL-2) handelt es sich um ein Zytokin, das von Antigen-aktivierten T-Zellen produziert wird und sowohl autokrin die T-Zellproliferation stimuliert (Gillis und Smith, 1977; Watson, 1979) als auch die apoptotischen Signale Antigen-stimulierter T-Zellen verstärkt. Damit ist IL-2 für die Induktion und die Regulation der T-Zell-vermittelten Immunantwort notwendig. Zudem stimuliert IL-2 die Proliferation und Differenzierung von NK Zellen und B-Zellen (Watson et al., 1979).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die Interaktion von Antigenpräsentation, Expression von Co-Rezeptoren und Zytokinproduktion das angeborene Immunsystem das erworbene Immunsystem aktiviert, wodurch die Ausbildung einer spezifischen Immunantwort erfolgt.

1.1.1 Die zellulären Bestandteile des Immunsystems

Alle zellulären Bestandteile des Blutes stammen von Vorläuferzellen, den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, ab. Diese Stammzellen teilen sich zunächst in lymphatische Vorläuferzellen und myeloische Vorläuferzellen. Durch weitere Differenzierungen entstehen aus lymphatischen Vorläuferzellen B- und T-Zellen als Zellen des erworbenen Immunsystems, während sich aus myeloischen Vorläuferzellen Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten und Mastzellen als Zellen des angeborenen Immunsystems entwickeln (Janeway, 2001).

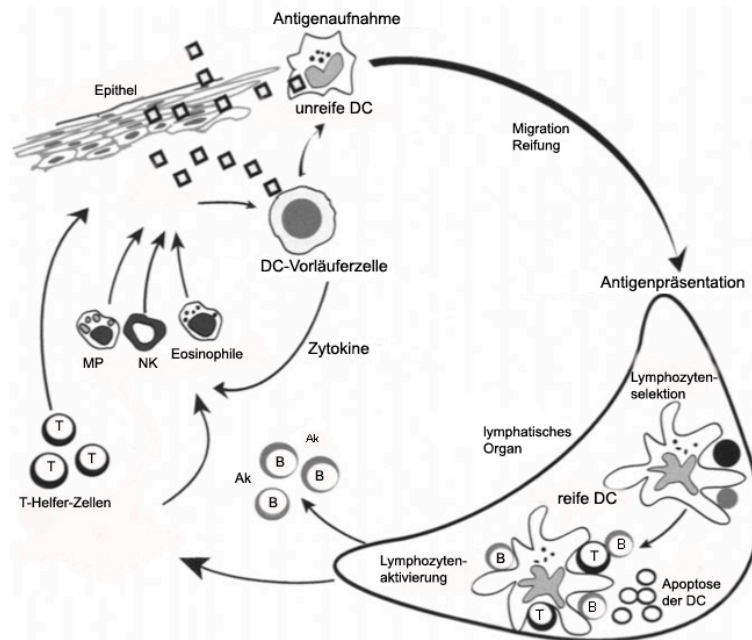
1.1.1.1 Charakterisierung dendritischer Zellen

Dendritische Zellen (dendritic cells, DCs) sind Antigen-präsentierende Zellen des angeborenen Immunsystems und stellen ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunantwort dar (Banchereau und Steinman, 1998). DCs können eine primäre Immunantwort auslösen und somit die Grundlage zur Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses bilden (Banchereau und Steinman, 1998; Bell et al., 1999; Hart, 1997; Steinman, 1991).

Vier Entwicklungsstadien können im Reifungsprozess der DCs unterschieden werden:

1. die Knochenmarksvorläuferzelle
2. die unreife dendritische Zelle, die durch Blut, Gewebe und Lymphe wandert und nach Antigenkontakt Zytokine sezerniert

3. die unreife dendritische Zelle, die im Gewebe persistiert und eine hohe Endozytose- und Phagozytosekapazität aufweist
4. die reife dendritische Zelle, die nach Pathogenerkennung in lymphatischen Organen über co-stimulatorische Moleküle Antigene präsentiert (Abbildung 1).



nach Banchereau, 2000

Abbildung 1 Der Lebenszyklus dendritischer Zellen (DC). DC-Vorläuferzellen zirkulieren durch das Gewebe und sezernieren nach Antigenkontakt Zytokine, die Eosinophile, Makrophagen (MP) und Natürliche Killerzellen (NK) aktivieren. Nach der Antigenaufnahme wandern die unreifen DCs zu lymphatischen Organen, wo sie reifen und Oberflächenmoleküle exprimieren, welche eine Antigen-spezifische Lymphozytenselektion ermöglichen. Die aktivierten T-Zellen wandern in das inflammatorische Gewebe, T-Helfer-Zellen sezernieren Zytokine, die Makrophagen, NK Zellen und Eosinophile aktivieren. B-Zellen (B) werden durch den Kontakt mit T-Zellen (T) und DCs aktiviert und reifen zu Plasmazellen, welche Pathogen-spezifische Antikörper (Ak) produzieren. Man vermutet, dass die DCs nach dem Kontakt mit Lymphozyten durch Apoptose sterben (Banchereau et al., 2000).

Diese Reifung der DCs beruht auf einem durch den nukleären Faktor κB (nuclear factor- κB , NF- κB)-vermittelten Prozess (Rescigno et al., 1998).

Die unreifen DCs weisen ein hohes Expressionsniveau an CD11c auf, tragen aber nur wenige MHC Moleküle und keine co-stimulatorischen Moleküle. Dies ermöglicht ihnen Antigene zu erkennen und an sie zu binden. Die Aufnahme des Antigens in die Zelle erfolgt durch Makropinozytose, Rezeptor-vermittelte Endozytose oder Phagozytose (Engering et al., 1997; Jiang et al., 1995; Reis e Sousa et al., 1993; Sallusto et al., 1995). Der Antigenkontakt löst bei den unreifen DCs phänotypische und funktionelle Veränderungen aus, die im Übergang von der Antigenaufnahme zur Antigenpräsentation gipfeln. Die Reifung der DCs ist eng

verbunden mit ihrer Wanderung aus der Peripherie zu den drainierenden lymphatischen Geweben, weshalb die Mobilität der DCs eine wichtige Eigenschaft in diesem Reifungsprozess ist (Austyn et al., 1988). Beim Auftreten von Antigenen akkumulieren DCs innerhalb von Stunden an der Eintrittspforte (McWilliam et al., 1996; McWilliam et al., 1994), was als Antwort auf die Produktion von Zytokinen in Folge lokaler Entzündungsprozesse gedeutet wird. Vollständig ausgereifte DCs haben ein hohes Expressionsniveau an den co-stimulatorischen und adhäsiven Molekülen CD40, CD54, CD80 und CD86 auf ihrer Zelloberfläche (Banchereau et al., 2000; Sallusto et al., 1995; Sallusto und Lanzavecchia, 1994; Zhou und Tedder, 1996).

Nach Aktivierung der DCs werden an der Zelloberfläche über MHC Moleküle Antigenpeptide den naiven $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen präsentiert, welche dadurch aktiviert und zur Proliferation angeregt werden (Inaba et al., 1990). Somit ist der erste Schritt zur Auslösung einer DC-T-Zell-Interaktion die Erkennung von MHC-Peptid-Komplexen durch die Antigen-spezifischen T-Zellrezeptoren. Der zweite entscheidende Faktor für die T-Zellaktivierung ist die Interaktion zwischen den co-stimulatorischen Molekülen, die von DCs exprimiert werden, und ihren von T-Zellen exprimierten Liganden (Inaba et al., 1994).

Durch die Bindung eines Antigens an den DC-Rezeptor wird der NF- κ B-vermittelte Signalweg aktiviert, woraufhin co-stimulatorische Moleküle exprimiert und Zytokine wie IL-6, IL-10 und IL-12 ausgeschüttet werden (Anderson, 2000; Medzhitov et al., 1997). Gleichzeitig wandern die DCs zu lymphatischen Organen, wo sie mit naiven Antigen-spezifischen T-Zellen zusammentreffen. Um die Aktivierung der naiven T-Zellen anzuregen, müssen den T-Zellen sowohl die an MHC Moleküle gebundenen Antigene als auch die co-stimulatorischen Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) präsentiert werden. Der zugehörige T-Zellrezeptor zu den B7 Molekülen ist CD28, dessen Co-Stimulation die Aktivierung der T-Zellen unterstützt. Die aktivierten T-Zellen exprimieren weitere Oberflächenproteine, welche die durch die co-stimulatorischen Moleküle B7.1 und B7.2 induzierte klonale Expansion und Differenzierung der T-Zellen aufrechterhalten und modifizieren. Eines dieser Proteine ist der CD40 Ligand, der an CD40 auf der Oberfläche dendritischer Zellen bindet. Durch die Bindung von CD40 Ligand an CD40 werden den T-Zellen weitere aktivierende Signale übermittelt. Gleichzeitig wird die dendritische Zelle zu einer verstärkten Expression von B7 Molekülen angeregt (Medzhitov et al., 1997).

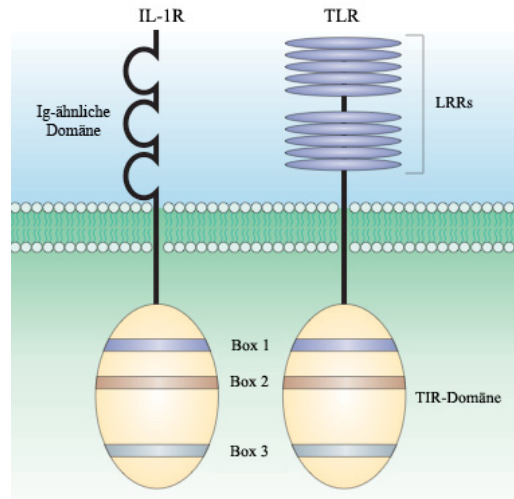
1.1.2 Mustererkennungsrezeptoren

Bei Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) handelt es sich um Rezeptoren, die Pathogene anhand von typischen Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) erkennen und eine Immunantwort einleiten (Janeway und Medzhitov, 1998). PRRs sind entweder im Serum/Gewebe, in der Membran oder im Zytoplasma lokalisiert und können dementsprechend grob in drei Gruppen eingeteilt werden. Weiter unterteilt man sie nach ihrer Struktur und/oder ihrer Funktion in Familien (Akira und Takeda, 2004).

1.1.2.1 Die Familie der Toll-like Rezeptoren

Die erste im Detail untersuchte Klasse der PRRs ist die Toll-like Rezeptor/Interleukin-1 Rezeptor (TLR/IL-1R)-Familie (Medzhitov, 2001).

Die Erforschung der Toll-like Rezeptor (TLR)-Familie begann mit der Entdeckung von Toll, einem Rezeptor, der für den Aufbau der dorsoventralen Polarität während der Embryogenese der Insekten wichtig ist (Hashimoto et al., 1988). Weitere Studien ergaben, dass Toll eine essentielle Rolle in der angeborenen Immunantwort gegen Hefeinfektionen spielt (Lemaitre et al., 1996). Über Datenbanken wurden zehn humane TLRs und 13 murine Mitglieder der TLR-Familie identifiziert (Takeda und Akira, 2005). Bei den TLRs handelt es sich um Typ I integrale Membranglykoproteine, deren N-Terminus extrazellulär liegt. Aufgrund der homologen zytoplasmatischen und transmembranen Toll/IL-1R (TIR)-Domäne, die eine entscheidende Rolle in der Initiierung der intrazellulären Signalkaskade spielt, werden die TLRs zur Familie der IL-1Rs gerechnet. Trotz dieses homologen, aus ca. 200 Aminosäuren bestehenden intrazellulären Anteils unterscheiden sich die Rezeptoren extrazellulär sehr stark: die TLRs bestehen aus Leucin-reichen Wiederholungsmotiven (leucine-rich repeats, LRRs), die für die Pathogenerkennung verantwortlich sind (Akira und Takeda, 2004), die extrazelluläre Region der IL-1Rs dagegen enthält drei Immunglobulin-ähnliche (Ig-ähnliche) Domänen (Abbildung 2).



nach Akira und Takeda, 2004

Abbildung 2 Die Struktur des Toll-like Rezeptors im Vergleich mit dem Interleukin-1 Rezeptor. TLRs und IL-1Rs haben eine konservierte zytoplasmatische Domäne, die als Toll/IL-1R (TIR)-Domäne bekannt ist. Die TIR-Domäne wird durch drei homologe Regionen (Box 1, 2 und 3) charakterisiert. Trotz der zytoplasmatischen Ähnlichkeit dieser Moleküle unterscheiden sich die extrazellulären Regionen: die TLRs haben zwei LRRs, während IL-1Rs drei Ig-ähnliche Domänen besitzen (Akira und Takeda, 2004). Abkürzungen siehe Text.

TLR1, 2, 4, 5 und 6 sind an der Zelloberfläche lokalisiert, während TLR3, 7, 8 und 9 in intrazellulären endosomalen Kompartimenten exprimiert werden (Akira und Takeda, 2004).

Verschiedene genetische Studien erforschten die den einzelnen TLRs zugehörigen Liganden. LPS, ein Bestandteil Gram-negativer Bakterien, wird zum Beispiel von TLR4 erkannt (Hoshino et al., 1999; Poltorak et al., 1998). Im Zusammenspiel mit TLR1 oder TLR6 erkennt TLR2 verschiedene bakterielle Bestandteile, einschließlich Peptidoglykane, Lipopeptide und Lipoproteine Gram-positiver Bakterien oder Mycoplasmen (Ozinsky et al., 2000; Takeuchi et al., 1999; Takeuchi et al., 2000; Takeuchi et al., 2002). TLR3 ist der Hauptrezeptor für doppelsträngige RNA, die von vielen Viren während der Replikationsphase gebildet wird (Alexopoulou et al., 2001). Dagegen erkennt TLR5 bakterielles Flagellin (Hayashi et al., 2001). Liganden für TLR7 sind synthetische Imidazoquinolin-ähnliche Moleküle, Guanosinanalogs, zum Beispiel Loxoribin, und einzelsträngige, virale RNA (single-stranded RNA, ssRNA) (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Hemmi et al., 2002). Während der humane TLR8 die Erkennung von Imidazoquinolonen und ssRNA vermittelt (Heil et al., 2003; Heil et al., 2004; Jurk et al., 2002), erkennt TLR9 bakterielle und virale CpG DNA Motive und das Malariapigment Hämозoin (Coban et al., 2005; Hemmi et al., 2000; Krug et al., 2004; Lund et al., 2003).

Eine Auflistung der TLRs und ihren Liganden ist in Tabelle 1 zu finden.

Rezeptor	Ligand	Herkunft des Ligand
TLR1	Triacyllipopeptide Lösliche Faktoren	Bakterien, Mycobakterien Neisseria meningitidis
TLR2	Peptidoglukan (PGN) Lipoteichonsäure Lipoarabinonmannan Zymosan	Gram-positive Bakterien Gram-positive Bakterien Mycobakterien Hefen
TLR3	doppelsträngige RNA	Viren
TLR4	Lipopolysaccharide (LPS) Taxol	Gram-negative Bakterien Pflanzen
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Diacyllipopeptide Lipoteichonsäure Zymosan	Mycoplasmen Gram-negative Bakterien Hefen
TLR7	Imidazoquinoline Loxoribine einzelsträngige RNA	synthetische Verbindungen synthetische Verbindungen Viren
TLR8	Imidazoquinoline einzelsträngige RNA	synthetische Verbindungen Viren
TLR9	Cytosin-Guanin Dinukleotide (CpG) Hämozoin	Bakterien, Viren Malariaplasmodien
TLR10	nicht nachgewiesen	nicht nachgewiesen
TLR11	nicht nachgewiesen	uropathogene Bakterien

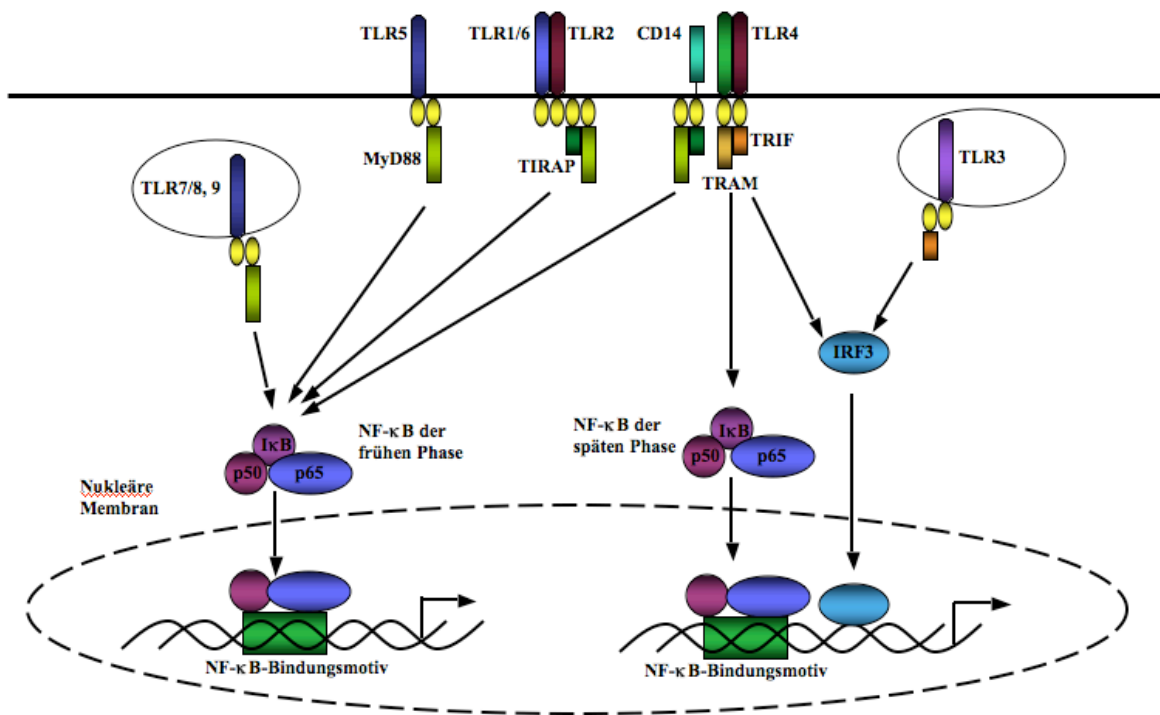
Tabelle 1 Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

nach Akira und Takeda, 2004

1.1.2.2 Die TLR/IL-1R-Signalkaskade

Nach der Bindung eines Liganden an TLR1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 oder 9 dimerisiert der Rezeptor und unterzieht sich einer Konformationsänderung, die notwendig für die Rekrutierung der nachfolgenden Signalmoleküle ist. Durch die Stimulation eines TLRs wird die Bindung der zytoplasmatischen TIR-Domäne des Rezeptors mit der TIR-Domäne eines Adaptors, wie zum Beispiel MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88), TIRAP (TIR domain-containing adapter protein), Trif (TIR domain-containing adapter inducing IFN β) oder TRAM (Trif-related adapter molecule) induziert. Im MyD88-abhängigen Signalweg von TLR2 und 4 bindet neben MyD88 auch TIRAP an die zytoplasmatische TIR-Domäne. Im weiteren Verlauf dieser Signalwege werden verschiedene Signalmoleküle aktiviert, die schließlich zu einer Phosphorylierung von I κ B (inhibitor of nuclear factor- κ B) mit nachfolgender Ubiquitinierung und Degradierung führen. Dies ermöglicht die Translokation von NF- κ B, einem dimeren Transkriptionsfaktor, der aus den fünf Untereinheiten p65/RelA, p50, p52, RelB oder c-Rel zusammengesetzt werden kann, in den Nucleus (Ghosh et al., 1998) und induziert in der frühen Wirkungsphase von NF- κ B die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (Medzhitov, 2007). In der späten Wirkungsphase von NF- κ B wird die Expression von Genen, die vor allem eine essentielle Funktion für die Aktivierung von Lymphozyten und die Ausprägung der Immunantwort haben, ausgelöst (Akira und Takeda, 2004).

Neben dem MyD88-abhängigen Signalweg existiert für TLR3 und 4 ein MyD88-unabhängiger Signalweg. Obwohl Trif von TLR3 und TLR4 zur Weiterleitung von Signalen benutzt wird, interagiert TLR4 nicht direkt mit Trif, sondern benötigt TRAM als weiteren Adaptor. Durch die C-terminale Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF3 (interferon-regulatory factor 3) wird die Translokation von IRF3 in den Nucleus ermöglicht. Die Aktivierung von IRF3 zieht die Produktion von IFN- β und die Expression von IFN-induzierenden Genen nach sich. Im Gegensatz zu TLR3 sendet TLR4 seine Signale sowohl über den MyD88-abhängigen wie auch über den MyD88-unabhängigen Signalweg, wobei der TLR3-Signalweg schneller und potenter reagiert als TLR4 (Akira und Takeda, 2004) (Abbildung 3).

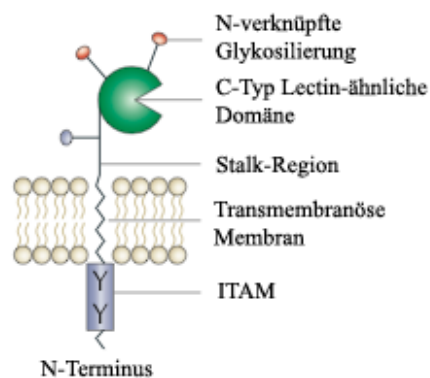


nach Akira und Takeda, 2004

Abbildung 3 Die TLR/IL-1R-Signalkaskade. Nach Stimulation von TLR1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 oder 9 bindet MyD88 an den Rezeptor und rekrutiert verschiedene Signalmoleküle. Durch die Degradation von I κ B α wird NF- κ B freigegeben und transloziert in den Kern, wo es die Expression inflammatorischer Zytokine reguliert. TIRAP ist in den MyD88-abhängigen Signalweg von TLR2 und 4 involviert. Die TLR3- und TLR4-vermittelte Aktivierung von IRF3 und die Induktion von IFN- β kann auf MyD88-unabhängige Weise erfolgen. Für diese MyD88-unabhängige Kaskade ist TRIF nötig. TRAM ist spezifisch für den TLR4-vermittelten MyD88-unabhängigen/TRIF-abhängigen Signalweg (Akira und Takeda, 2004). Abkürzungen siehe Text.

1.1.2.3 Der Dectin-1 Rezeptor

Ein weiterer gut charakterisierter PRR ist Dectin-1 (dendritic-cell-associated C-type lectin-1), der aufgrund seiner Struktur zur Familie der „myeloid-cell-expressed natural killer-cell-receptor-like C-type lectin“ gerechnet wird. Dabei unterscheidet sich Dectin-1 von den meisten Rezeptoren aus dieser Familie durch zwei entscheidende Ausnahmen. Zum einen fehlen Dectin-1 in der Stalk-Region Cystein-Reste, weshalb der Rezeptor wahrscheinlich nicht dimerisiert (Ariizumi et al., 2000), zum anderen enthält Dectin-1 ein ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) in seinem zytoplasmatischen Anteil, welches an der zellulären Aktivierung beteiligt ist (Ariizumi et al., 2000; Brown et al., 2003; Gantner et al., 2003; Rogers et al., 2005) (Abbildung 4).



nach Brown, 2006

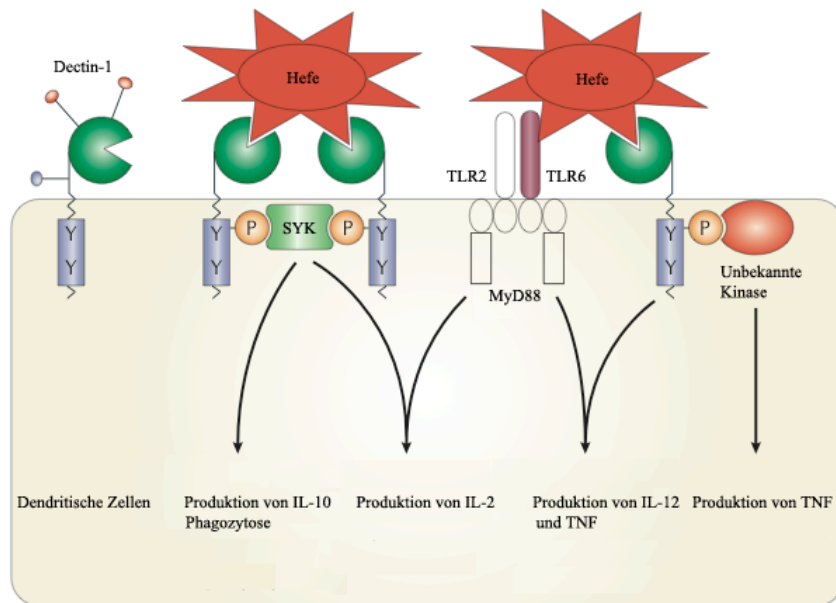
Abbildung 4 Die Struktur von Dectin-1. Dectin-1 ist ein Typ II transmembranöser Rezeptor der Familie der „NK-cell-receptor-like C-type lectins“ mit einer einzelnen extrazellulären C-Typ Lectin-ähnlichen Domäne, mit welcher der Rezeptor β -Glukane erkennt. Diese Domäne wird von der Membran durch die Stalk-Region separiert. Der zytoplasmatische Anteil von Dectin-1 enthält ein ITAM, welches intrazellulär Signale vermittelt (Brown, 2006). Abkürzungen siehe Text.

Dectin-1 wird von dendritischen Zellen, Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen und ausgewählten T-Zellen exprimiert (Taylor et al., 2002), wobei die Expressionsstärke von verschiedenen Zytokinen, Steroiden und mikrobiellen Stimuli beeinflusst wird (Willment et al., 2003). Zum Beispiel verstärken IL-4 und IL-13 die Expression von Dectin-1 auf der Zelloberfläche, während LPS und Dexamethason sie vermindern (Willment et al., 2003). Spezifisch erkennt Dectin-1 lösliche und feste $\beta(1-3)$ - und $\beta(1-6)$ -verbundene Glukane (Brown und Gordon, 2001), bei denen es sich um Kohlenhydratpolymere mit immunmodulatorischer Aktivität handelt und die überwiegend in den Zellwänden von Pilzen, aber auch von Pflanzen und Bakterien vorkommen. Einer der klassischen Dectin-1-Liganden ist Zymosan, ein Zellwandextrakt aus *Saccharomyces cerevisiae*, das hauptsächlich aus β -Glukanen, aber auch aus Chitin, Protein, Lipiden und Mannan besteht. Weitere von Dectin-1

erkannte Hefe- und Pilzspezies sind *Candida spp.* (Brown et al., 2003), *Pneumocystis spp.* (Steele et al., 2003), *Coccidioides spp.* (Viriyakosol et al., 2005) und *Aspergillus spp.* Außerdem erkennt Dectin-1 einen endogenen, noch undefinierten T-Zell-Liganden. Dectin-1 kann sowohl an CD4⁺ T-Zellen wie auch an CD8⁺ T-Zellen binden, weshalb man annimmt, dass Dectin-1 auch als co-stimulatorisches Molekül in Erscheinung tritt (Ariizumi et al., 2000).

1.1.2.4 Der Dectin-1-vermittelte intrazelluläre Signalweg

Dectin-1 ist einer der ersten nicht-TLR PRRs, dessen Signalweg näher charakterisiert wurde (Brown, 2006). Nach Stimulation von Dectin-1 durch unlösliche β -Glukane, wie zum Beispiel Zymosan, induziert Dectin-1 die Produktion verschiedener Zytokine und Chemokine und die Aufnahme des Liganden durch Phagozytose. Die phagozytierten Liganden werden über freigesetzte zytotoxische Substanzen abgetötet („respiratory burst“) (Gantner et al., 2003; Underhill et al., 2005). Für die meisten dieser Reaktionen reichen die Dectin-1-vermittelten Signale aus, nur für die Induktion bestimmter pro-inflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel TNF oder IL-12, werden noch zusätzliche Signale von TLR2 und TLR6 über MyD88 (Kataoka et al., 2002) und NF- κ B (Young et al., 2001) benötigt. Diese Kooperation beweist, dass auch nicht-TLR PRRs aktiv an der Ausbildung einer Immunantwort mitwirken. Die Fähigkeit von Dectin-1 Signale weiterzuleiten, wird durch das zytoplasmatische ITAM bestimmt. Die Ligandenbindung an den Rezeptor führt zur Tyrosinphosphorylierung des ITAM (Gantner et al., 2003), was für die Interaktion mit SYK (spleen tyrosine kinase) ausreicht (Rogers et al., 2005; Underhill et al., 2005). Dectin-1 kann jedoch auch unabhängig von SYK Signale weiterleiten, wie dies der Fall ist für die Dectin-1-vermittelte Produktion von TNF und IL-12 in Makrophagen (Rogers et al., 2005; Underhill et al., 2005) und dendritischen Zellen (siehe Abbildung 5) (Rogers et al., 2005).



nach Brown, 2006

Abbildung 5 Die Dectin-1-vermittelte Signaltransduktion. Durch Ligandenbindung wird Dectin-1 Tyrosinphosphoryliert (P) und induziert eine intrazelluläre Signalkaskade, die in verschiedenen Zell-spezifischen Antworten resultiert. Der zytoplasmatische Anteil von Dectin-1 interagiert mit der Kinase SYK. Obwohl über SYK direkt zelluläre Antworten induziert werden, wie die Produktion von IL-10, sind TLRs für die Produktion von IL-2 notwendig. SYK vermittelt ebenso die Phagozytose. In diesem Signalweg aktiviert Dectin-1 durch die Kollaboration mit TLRs die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (zum Beispiel TNF), obwohl Dectin-1 auch fähig ist, direkt die TNF-Produktion in dendritischen Zellen zu induzieren (Brown, 2006).

1.1.3 Bcl10 und Malt1 als Schlüsselproteine der adaptiven Immunantwort

Zwei Signalproteine, die für die Initiierung der adaptiven Immunantwort notwendig sind, sind Bcl10 und Malt1. Diese Signalproteine spielen eine Schlüsselrolle in der Antigenrezeptor-vermittelten Lymphozytenaktivierung (Thome, 2004).

1.1.3.1 Charakterisierung von Bcl10

Das humane *Bcl10* (B cell lymphoma 10)-Gen kodiert ein Protein aus 223 Aminosäuren mit einer N-terminalen Caspase-rekrutierenden Domäne (caspase recruitment domain, CARD). Diese CARD-Domäne vermittelt die Selbst-Oligomerisierung, während die C-terminale Region von Bcl10 reich an Serin- und Threoninresten ist und phosphoryliert werden kann (Koseki et al., 1999; Srinivasula et al., 1999). Bcl10 wird über die ganze Entwicklung hinweg in allen Geweben exprimiert, besonders ausgeprägt ist die Expression im lymphatischen Gewebe und im sich entwickelnden zentralen Nervensystem (Costanzo et al., 1999; Koseki et al., 1999; Srinivasula et al., 1999; Thome et al., 1999).

Die chromosomale Translokation t(1;14)(p22;q32) in Lymphomen des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (mucosa-associated lymphoid tissues, MALT) führt zur Überexpression von Bcl10 und ist assoziiert mit Leserasterverschiebungen, die zu C-terminalen Leseabbrüchen distal der CARD-Domäne führen (Willis et al., 1999; Zhang et al., 1999). Mutationen von Bcl10 werden auch in folliculären Lymphomen und diffus großzelligen B-Zell Lymphomen gefunden (Du et al., 2000). Überexpressionsstudien von Bcl10 in Zelllinien zeigten, dass Bcl10 NF- κ B aktiviert, wofür die CARD-Domäne ausreichend und notwendig ist (Koseki et al., 1999; Thome et al., 1999; Willis et al., 1999; Yan et al., 1999). Weiterhin ist Bcl10 wichtig für den Neuralrohrschluss während der Embryogenese, die Regulation der Lymphozytenproliferation und die Vermittlung der NF- κ B-Aktivierung in B- und T-Zellen nach Antigenstimulation (Jun und Goodnow, 2003; Ruland et al., 2001).

1.1.3.2 Charakterisierung von Malt1

Die humane Paracaspase Malt1 (mucosa-associated lymphoid tissue 1) wurde identifiziert als ein Caspase-ähnliches Protein, das mit den so genannten Metacaspasen in Pflanzen, Pilzen und Protozoen verwandt ist (Thome, 2004). Die molekulare Struktur von Malt1 ist charakterisiert durch eine N-terminale Todesdomäne (death domain, DD), die mit gleichartigen Proteinen interagiert und verwandt zur CARD-Domäne ist (Hofmann et al., 1997). Auf die DD folgen zwei Immunoglobulin-ähnliche Domänen und eine C-terminale Caspase-ähnliche Domäne (Uren et al., 2000).

Die Vermutung, dass Malt1 im Bcl10-abhängigen Signalweg der NF- κ B-Aktivierung involviert ist, beruhte auf der Beobachtung, dass das für Malt1 kodierende Gen ähnlich wie Bcl10 der chromosomalen Translokation t(11;18)(q21;q21) unterliegt und mit der Pathogenese des MALT B-Zell Lymphoms assoziiert ist (Wotherspoon, 2002). Zudem sah man in Überexpressionsstudien, dass für eine synergistische Aktivierung von NF- κ B durch Bcl10 und Malt1 sowohl die Fähigkeit von Malt1 an Bcl10 zu binden wie auch eine intakte Malt1-Caspase-ähnliche Domäne notwendig sind (Lucas et al., 2001). Sagaert *et al.* zeigten, dass Bcl10 und Malt1 in der Pathogenese des MALT Lymphoms miteinander interagieren (Sagaert et al., 2006). Weitere Untersuchungen Malt1-defizienter Mäuse zeigten, dass die gezielte Störung von Malt1 in einer defekten adaptiven Immunantwort resultiert (Ruland et al., 2003). Malt1 ist notwendig für die T-Zell-Rezeptor-vermittelte zelluläre Proliferation, Aktivierung und Zytokinproduktion und die Entwicklung von Marginalzonen- und B1 B-Zellen (Ruland et al., 2003). Jedoch ist Malt1 im Gegensatz zu Bcl10 weitgehend entbehrlich

für die Antigenrezeptor-vermittelte Aktivierung von konventionellen B2 B-Zellen und die embryonale Entwicklung (Ruland et al., 2003).

2 Material und Methoden

2.1 Bestimmung des Mausgenotyps mittels Polymerasekettenreaktion

Zum Genotypisieren der Mäuse wurde aus einem Stück Mausschwanz mit Hilfe des Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega) die DNA extrahiert und mittels der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) amplifiziert.

Für einen 25µl-PCR-Ansatz zur Amplifikation einer DNA-Vorlage benötigte man:

- 10,25µl PCR-H₂O (Aqua ad injectabilia Delta Select)
- 5,0µl 5xEnhancer Solution P (peqlab)
- 2,5µl dNTP-Mix 25mM (Desoxynukleotidtriphosphate, BIOLINE)
- 2,0µl 10xReaktionspuffer Y (peqlab)
- 1,0µl flankierender Primer 10µM (alle Primer von MWG-Biotech AG)
- 1,0µl Wildtyp-Primer 10µM
- 1,0µl NEO-Primer 10µM
- 0,25µl Taq-DNA-Polymerase 5u/µl (peqlab)
- 2,0µl DNA

Um das Wildtyp-Allel von Bcl10 zu amplifizieren, verwendeten wir folgende DNA-Oligonukleotide:

Bcl10-Wildtyp-Primer: 5'-TTG GCT CTC TGC TCT CCT CAC T-3'

Flankierender Primer: 5'-CGC TCT GAG GAC TGT GGG ACT G-3'

Die erwartete Bande hat eine Länge von 560 Basenpaaren (bp).

Um das mutierte Allel von Bcl10 zu amplifizieren, verwendeten wir folgende DNA-Oligonukleotide:

NEO-Primer: 5'-GGG TGG GAT TAG ATA AAT GCC TGC TC-3'

Flankierender Primer: 5'-CGC TCT GAG GAC TGT GGG ACT G-3'

Die erwartete Bande hat eine Länge von 336bp.

Um das Wildtyp-Allel von Malt1 zu amplifizieren, verwendeten wir folgende DNA-Oligonukleotide:

Malt1-Wildtyp-Primer: 5'-ACT TTC ATC TTG CCA GCA CTC TTT CTT A-3'

Flankierender Primer: 5'-CTG CTG CTG ACA TGC TAC AAT ATG CTG-3'

Die erwartete Band hat eine Länge von 502bp.

Um das mutierte Malt1-Allel zu amplifizieren, verwendeten wir folgende DNA-Oligonukleotide:

NEO-Primer: 5'-GGG TGG GAT TAG ATA AAT GCC TGC TC-3'

Flankierender Primer: 5'-CTG CTG CTG ACA TGC TAC AAT ATG CTG-3'

Die erwartete Bande hat eine Länge von 400bp.

Initial wurde die doppelsträngige DNA im MyCycler™ (BIO RAD) für 4min bei 92°C denaturiert. Darauf folgten 35 Zyklen aus Denaturationsphase (1min, 92°C), Anlagerungsphase (1min, 68°C für Bcl10 und 62°C für Malt1) und Extensionsphase (1min, 72°C).

Zur Auftrennung der DNA-Stränge wurden die PCR-Proben auf ein Agarosegel aufgetragen.

Ein 1%-iges Agarosegel bestand aus:

100ml 1xTAE (40mM Tris-Acetat, 2mM EDTA, pH 8,2, Roth)

1g Agarose (SeaKem LE Agarose, CAMBREX)

1 Tropfen Ethidiumbromid 0,7mg/ml (eurobio)

Da die kürzeren und kompakteren DNA-Moleküle schneller liefen als die größeren, kam es zur Auftrennung der DNA.

2.2 Kultivierung dendritischer Zellen aus Knochenmark

Aus dem Knochenmark stammende dendritische Zellen (bone marrow derived dendritic cells, BM-DCs) kultiviert man aus pluripotenten Knochenmarksstammzellen. Dazu wurden genotypisierten Mäusen Tibia und Femur entnommen und aus den Knochen das Knochenmark gespült. Nach osmotischer Lyse der Erythrozyten mittels 1x RBC Lysis Buffer (eBioscience) wurden die Zellen in einer Dichte von 4×10^5 Zellen/ml auf Bakterienschalen (Abimed) in DC-Medium ausgesät und über neun Tage im Inkubator bei 37°C und 5,0% CO₂ kultiviert.

DC-Medium setzte sich wie folgt zusammen:

RPMI 1640 Medium (Invitrogen)

10% FCS (Fetal Bovine Serum mit einem Endotoxin/LPS-Anteil < 0,2EU, PERBIO)

20ng/ml GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, PeproTech)

100units/ml Penicillin-Streptomycin (Invitrogen)

2mM L-Glutamine (Invitrogen)

50µM β-Mercaptoethanol (Invitrogen)

Am dritten Tag wurden 10ml DC-Medium dazugegeben, am sechsten Tag wurden 10ml abgenommen und durch frisches DC-Medium ersetzt. Am neunten Tag wurden die BM-DCs geerntet und für die weiteren Versuche auf Zellkulturplatten (Invitrogen) ausgesät.

2.3 Färbung der BM-DCs zur Analyse mittels Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)

Für die FACS-Analyse von BM-DCs wurden folgende Antikörper verwendet:

anti-Maus MHC Class II (BD Pharmingen)

anti-Maus CD11c (eBiosciences) als Marker für dendritische Zellen

anti-Maus CD16/32 (eBiosciences) als Fc-Rezeptor-Block

Propidiumjodid (Propidium Iodide Solution, 10mg/ml, Sigma) zur Anfärbung der toten Zellen

Zum Waschen der Zellen benötigte man FACS-Puffer:

1x PBS (Gibco)

10% FCS

0,05% Na-Acid (Roth)

Um unspezifische Antikörperbindungen an die Fc-Rezeptoren zu verhindern, wurden die Fc-Rezeptoren mit 5µg/ml anti-Maus CD16/32 blockiert. Für die FACS-Analyse wurden die Zellen mit 25µg/ml anti-Maus MHC Class II, 25µg/ml anti-Maus CD11c und 500µg/ml Propidiumjodid gefärbt. Nach der Färbung der Zellen wurden sie mit FACS-Puffer gewaschen, 5min bei 300g zentrifugiert und erneut in FACS-Puffer resuspendiert.

2.4 Analyse der Zytokinsekretion mittels Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Zur Induktion der Zytokinproduktion wurden die BM-DCs über 24h mit folgenden Reagenzien stimuliert:

Zymosan 1µg/ml – 10µg/ml (Sigma) als Dectin-1-Ligand

LPS 1ng/ml (Invivogen) als TLR4-Ligand

PGN 10µg/ml (Invivogen) als TLR2-Ligand

CpG 1nM (Invivogen) als TLR9-Ligand

Candida albicans (Stamm SC5314) wurde von Rudolf Rupec erhalten. *Candida albicans* wurde auf Blutagar-Platten bei 30°C kultiviert. Vor der Stimulation wurde *Candida albicans* von der Platte gespült, dreimal gewaschen und dann in kaltem PBS resuspendiert. Zur Hitzeinaktivierung wurden die Zellen 1h gekocht.

Nach Abschluss der Stimulationsdauer wurden die Überstände abgenommen, 5min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und zellfrei in ein frisches Gefäß überführt. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Die Zytokine IL-10, TNF- α und IL-2 wurden mit den OptiEIA ELISA-Kits von BD Pharmingen bestimmt.

2.5 Anfertigung von Immunfluoreszenzen

Für die Anfertigung wurden BM-DCs auf 20mm Deckgläsern (Thermo Scientific) in 6-Loch-Platten (Omnilab) in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Loch ausgesät. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in gekühltem Methanol für 5min fixiert und dann für 30min bei RT in einem Blockpuffer, bestehend aus 1x PBS mit 10% FCS und 0,1% Triton-X100 (Sigma), geblockt und permeabilisiert. Zuerst wurden die Zellen mit dem polyclonalen anti-p65 Antikörper (Santa Cruz) für eine 1h bei RT inkubiert, dann kurz mit DAPI zur Zellkernfärbung behandelt. Die Zellen wurden 2x in Blockpuffer gewaschen und mit dem Zweitantikörper Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Blockpuffer wurden die Proben in Vecashield Einbettmedium (Vector Laboratories) aufgenommen und mit Hilfe eines Konfokalmikroskops (LSM510, Zeiss) analysiert. Die Bilder wurden mit Image Browser Software (Zeiss) ausgewertet.

3 Ergebnisse

Während die Rolle von *Bcl10* und *Malt1* in der erworbenen Immunantwort umfassend erforscht ist, gab es zu Beginn dieser Arbeit nur wenige Hinweise, dass *Bcl10* und *Malt1* auch an der angeborenen Immunantwort beteiligt sind. Um die Beteiligung von *Bcl10* und *Malt1* am angeborenen Immunsystem näher zu charakterisieren, untersuchten wir dendritische Zellen als Zellen des angeborenen Immunsystems aus Mäusen, bei denen eine funktionelle Deletion der Gene *Bcl10* oder *Malt1* vorlag. Diese Untersuchungen zeigten, dass *Bcl10* und *Malt1* für die Signaltransduktion nach Erkennung von Hefen durch das angeborene Immunsystem notwendig sind.

3.1 Normale Differenzierung und Funktionalität von BM-DCs *in vitro*

Zunächst stellte sich die Frage, ob die Differenzierung der BM-DCs durch die genetische Deletion von *Bcl10* oder *Malt1* beeinflusst wird. Deshalb wurde die Differenzierung der BM-DCs, die mittels GM-CSF aus den Knochenmarksvorläuferzellen von Wildtyp-Mäusen (wt), *Bcl10*-defizienten Mäusen (*Bcl10*^{-/-}) und *Malt1*-defizienten Mäusen (*Malt1*^{-/-}) kultiviert wurden, untersucht.

Alle Zellen zeigten einen normalen, unreifen DC-Phänotyp mit einem hohen Expressionsniveau des Oberflächenmoleküls CD11c und einer mittelstarken Expression des MHC Klasse II Haupthistokompatibilitätskomplexes (Abbildung 6). In allen drei Genotypen reifte ein sehr geringer Prozentsatz an Zellen vollständig aus, was sich an einem sehr hohen MHC II-Expressionsniveau festmachen ließ. Zwischen den Genotypen war kein Unterschied in der Differenzierung erkennbar, woraus man schließen konnte, dass *Bcl10* und *Malt1* für eine normale Entwicklung von BM-DCs *in vitro* nicht benötigt werden.

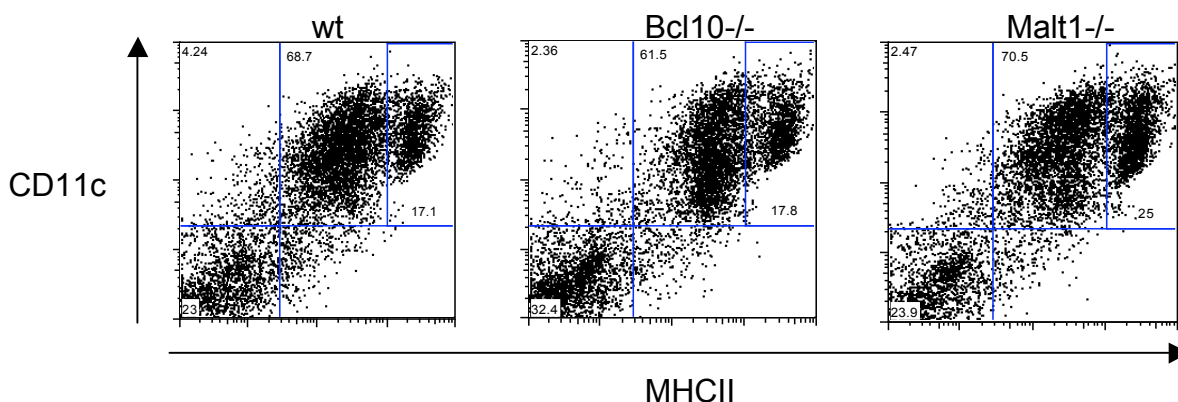


Abbildung 6 Normale Differenzierung der *Bcl10*^{-/-} und *Malt1*^{-/-} BM-DCs im Vergleich mit wt BM-DCs.

3.2 Bcl10 und Malt1 als Teil des Dectin-1-vermittelten Signalweges

Ein Signalweg in DCs, der in die angeborene Immunantwort involviert ist, ist der durch den β -Glukan Rezeptor Dectin-1-vermittelte Signalweg. Dectin-1 verfügt über ein ITAM, das zur Signalweiterleitung benötigt wird.

Zur Untersuchung des Dectin-1-Signals wurden wt, Bcl10^{-/-} und Malt1^{-/-} BM-DCs mit unterschiedlichen Konzentrationen des Dectin-1-Liganden Zymosan stimuliert und mittels ELISA die produzierte Zytokinmenge bestimmt. Die wt BM-DCs produzierten abhängig von der verwendeten Dosis Zymosan die Zytokine TNF- α , IL-2 und IL-10. Die Zymosan-vermittelte Zytokinproduktion in den Bcl10- und Malt1-defizienten BM-DCs wies unabhängig von der Dosis schwere Defekte auf (Abbildung 7).

Es zeigte sich daher, dass Bcl10 und Malt1 notwendige Bestandteile des Dectin-1-vermittelten Signalweges sind.

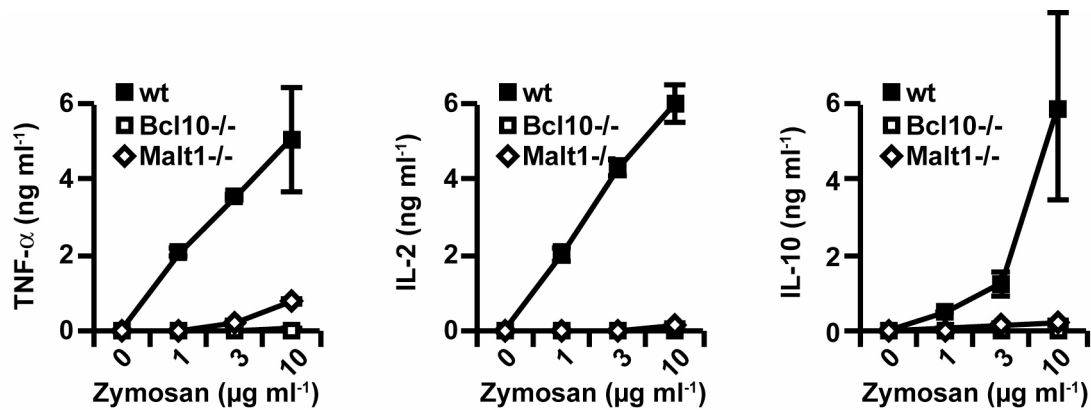


Abbildung 7 Bcl10 und Malt1 sind notwendig für die Zymosan-induzierte Zytokinproduktion. Die aus wt, Bcl10^{-/-} und Malt1^{-/-} Mäusen kultivierten BM-DCs wurden über 24h mit Zymosan (1, 3 und 10 μ g/ml) stimuliert und die Produktion von TNF- α , IL-2 und IL-10 gemessen. Die Daten sind mit der Standardabweichung aus Triplets dargestellt und repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Da es sich bei dem gerade beschriebenen Defekt in der Zytokinproduktion auch um einen generellen zellulären Defekt in der Aktivierung und Funktionalität der Zellen handeln kann, wurden weitere Signalwege des angeborenen Immunsystems untersucht. Die am besten untersuchten Signalwege des angeborenen Immunsystems sind die der Familie der Toll-like Rezeptoren. Um deren Funktionalität zu untersuchen, wurden Bcl10- und Malt1-defiziente BM-DCs mit LPS (TLR4-Ligand), CpG (TLR9-Ligand) und PGN (TLR2-Ligand) stimuliert und die durch die Stimulationen induzierte Zytokinproduktion gemessen.

Bcl10^{-/-} und Malt1^{-/-} BM-DCs produzierten im Vergleich mit wt BM-DCs nach Stimulation mit LPS, CpG oder PGN ähnlich hohe Mengen an TNF- α (Abbildung 8).

Da nach TLR-Stimulation keine Defekte in der Produktion von TNF- α nachgewiesen werden konnten, schlossen wir, dass der beobachtete Defekt im Dectin-1-vermittelten Signalweg nicht auf einer generellen Funktionsstörung der Bcl10- und Malt1-defizienten DCs beruht.

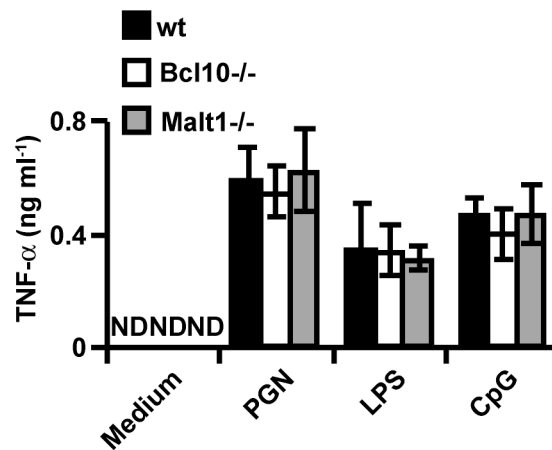


Abbildung 8 Normale Zytokininduktion in Bcl10^{-/-} und Malt1^{-/-} BM-DCs nach TLR-Stimulation. Die Produktion von TNF- α in wt, Bcl10^{-/-} und Malt1^{-/-} BM-DCs nach Stimulation mit einem der TLR-Stimuli PGN (20 μ g ml⁻¹), LPS (100 ng ml⁻¹) oder CpG (1 μ M) über 24h ist vergleichbar. Die Daten sind mit Standardabweichung aus Triplets dargestellt. ND, nicht detektierbar.

3.3 Aktivierung von NF- κ B über Bcl10 und Malt1

Um den zugrunde liegenden Mechanismus des unter 3.2 beschriebenen Defektes im Dectin-1-vermittelten Signalweg genauer zu analysieren, untersuchten wir die NF- κ B-Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern.

Hierzu wurden Immunfluoreszenzen der BM-DCs der drei Genotypen nach Stimulation mit Zymosan oder LPS angefertigt. Die zelluläre Lokalisation des NF- κ B-Familienmitgliedes RelA, das eine transaktivierende Domäne enthält, zeigte, dass im Vergleich mit den wt BM-DCs sowohl in den Bcl10^{-/-} BM-DCs als auch in den Malt1^{-/-} BM-DCs eine verringerte Translokation von RelA in den Zellkern nach einer Stimulation mit Zymosan (Abbildung 9). Auf die Stimulation mit LPS dagegen translozierte RelA in den drei Genotypen auf vergleichbare Weise.

Aus diesen Ergebnissen folgerten wir, dass sich die beobachteten Defekte in der Dectin-1-vermittelten Zytokinproduktion auf eine gestörte NF- κ B-Translokation zurückführen lassen.

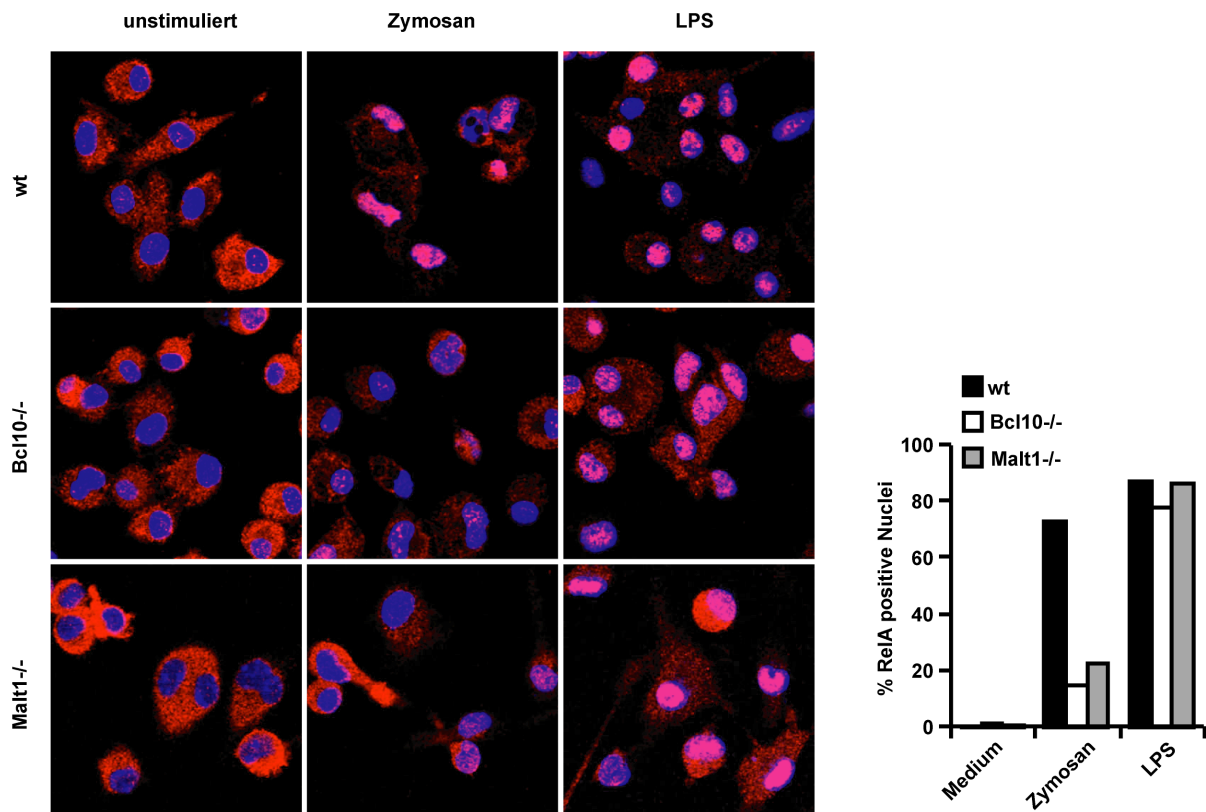


Abbildung 9 Der spezifische Defekt in der Zymosan-induzierten NF- κ B-Aktivierung in Bcl10^{-/-} und Malt1^{-/-} BM-DCs. Aus wt, Bcl10^{-/-} oder Malt1^{-/-} Mäusen kultivierte BM-DCs wurden mit Zymosan oder LPS stimuliert. Die Translokation von RelA (rot) in den Nucleus (DAPI-Färbung blau, Co-Lokalisation pink) wurde mittels Immunfluoreszenz dargestellt und durch die Bestimmung der Häufigkeit von RelA-positiven Nuclei in mindestens 100 individuellen Zellen quantifiziert.

3.4 Bestätigung der Resultate mit *Candida albicans*

Um nachzuweisen, dass die Defekte in Zytokinexpression und NF- κ B-Translokation nicht nur auf den Zellwandbestandteil Zymosan aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beschränkt sind, sondern auch auf weitere Hefen übertragbar sind, wurden BM-DCs aller drei Genotypen (wt, Bcl10^{-/-}, Malt1^{-/-}) mit Hitze-inaktivierten *Candida albicans* Zellen stimuliert. Wie schon mit Zymosan zeigte sich, dass die Produktion von TNF- α , IL-2 und IL-10 in Bcl10^{-/-} und Malt1^{-/-} BM-DCs gestört ist (Abbildung 10).

Aus diesen Beobachtungen schlussfolgerten wir, dass Bcl10 und Malt1 eine wichtige Rolle für die Induktion der angeborenen Abwehrmechanismen gegen Hefen spielen.

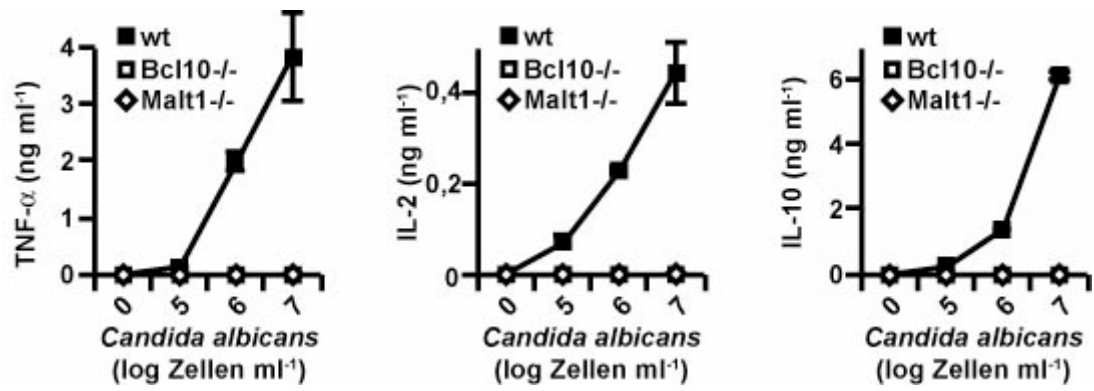


Abbildung 10 *Candida albicans*-induzierte Produktion von TNF- α , IL-2 oder IL-10 in Bcl10^{-/-} und Malt1^{-/-} BM-DCs. Die Zellen wurden über 24h mit Hitze-inaktivierten *Candida albicans* stimuliert. Die Daten sind mit Standardabweichung aus Triplets dargestellt.

4 Diskussion

Im Gegensatz zur Antwort des angeborenen Immunsystems gegen Viren und Bakterien ist nur wenig bekannt über die Immunantworten gegen Pilze. Einer der Schlüsselrezeptoren für die Erkennung von Pilzen ist Dectin-1, welcher eine angeborene Immunantwort auslöst und die adaptive Immunantwort induziert (Brown, 2006). Dieser Rezeptor zählt zu den nicht-TLR Rezeptoren und benutzt ein intrazelluläres ITAM, um die Signalkaskade via Syk über MyD88-unabhängige Signalwege weiterzuleiten (Rogers et al., 2005). Durch die Untersuchung der Rolle von Bcl10 und Malt1 in dendritischen Zellen wurde der Dectin-1-medierte Signalweg weiter aufgeschlüsselt. So konnten neue molekulare Mechanismen aufgezeigt werden, die zu einem besseren Verständnis führen wie das angeborene Immunsystem Pilze erkennt und bekämpft.

4.1 Bcl10 und Malt1 sind für die Differenzierung dendritischer Zellen entbehrlich

Bcl10 und Malt1 sind an verschiedenen Signalwegen beteiligt, die die Aktivierung von NF- κ B regulieren. Bcl10 wurde als ein Protein innerhalb der Signalkaskade vom T-Zell-Rezeptor über den IKK-Komplex nach NF- κ B identifiziert (Ruland et al., 2001). Ein weiteres Protein innerhalb dieses Signalweges stellt Malt1 dar, das von Bcl10 oligomerisiert wird (Lucas et al., 2001; Uren et al., 2000) und ein essenzieller Bestandteil des Bcl10-Signaltransduktionskomplexes ist (Ruland et al., 2003). Die Aktivierung von NF- κ B ist notwendig für die Antigen-induzierte Proliferation, Zytokinproduktion und das Überleben der T-Zellen (Kane et al., 2002). Bisher noch unbekannt war, ob Bcl10 oder Malt1 für die Differenzierung unreifer dendritischer Zellen aus Knochenmarksvorläuferzellen benötigt werden. Daher wurde die Differenzierung dendritischer Zellen, die aus dem Knochenmark von Bcl10- oder Malt1-defizienten Mäusen mit dem Wachstumsfaktor GM-CSF kultiviert wurden, anhand der Analysen der Oberflächenmarker MHC II und CD11c untersucht. Die Zellen Bcl10- und Malt1-defizienter Mäuse wiesen im Vergleich mit denen der Wildtypmäuse keine Unterschiede im Expressionsniveau von MHC II und CD11c auf (Abbildung 6). Daraus kann geschlossen werden, dass die Differenzierung dendritischer Zellen von der Vorläuferzelle zur unreifen dendritischen Zelle mittels GM-CSF unbeeinflusst von der Defizienz von Bcl10 und Malt1 möglich ist.

4.2 Bcl10 und Malt1 als Teil der angeborenen Immunantwort

Dass Bcl10 und Malt1 in die Signaltransduktion vom B- und T-Zellrezeptor zum Transkriptionsfaktor NF- κ B involviert sind, wurde anhand der Analyse von Bcl10- und

Malt1-defizienten Mäusen eingehend untersucht (Ruland et al., 2001; Ruland et al., 2003). Klemm *et al.* zeigten, dass Bcl10 und Malt1 nach Stimulation des ITAM Rezeptors Fc ϵ RI an der Aktivierung von NF- κ B und der Zytokinproduktion in Mastzellen beteiligt sind (Klemm et al., 2006). Da Mastzellen zur Gruppe der myeloischen Zellen gehören, wird impliziert, dass der Bcl10/Malt1 Signalkomplex nicht auf lymphatische Zellen und deren Antigenrezeptoren beschränkt ist, sondern auch in weiteren myeloischen Zellen wie dendritischen Zellen wichtig ist. Dendritische Zellen erkennen über PRRs Pathogene, welche den Zellen des erworbenen Immunsystems präsentiert werden. So werden verschiedene Hefe- und Pilzspezies, wie *Candida spp.*, *Pneumocystis spp.*, *Coccidioides spp.* und *Aspergillus spp.*, und auch Zymosan, ein Zellwandextrakt aus *Saccharomyces cerevisiae*, über den PRR Dectin-1 erkannt.

Um eine Beteiligung von Bcl10 und Malt1 in der von dendritischen Zellen vermittelten Immunantwort gegen Hefen zu untersuchen, stimulierten wir Bcl10- und Malt1-defiziente DCs mit dem Dectin-1-Liganden Zymosan. Im Vergleich zu den wt BM-DCs beobachteten wir eine defekte Sekretion der Zytokine TNF- α , IL-2 und IL-10 in den Bcl10- und Malt1-defizienten BM-DCs (Abbildung 7).

Da ein genereller Funktionsdefekt der Bcl10- und Malt1-defizienten dendritischen Zellen nicht ausgeschlossen war, untersuchten wir die Zytokinsekretion nach Stimulation weiterer PRRs, die von dendritischen Zellen exprimiert werden. Zu den am besten untersuchten Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zählen die Toll-like Rezeptoren und ihre Signalwege. Um die intakte Aktivierbarkeit der Bcl10- und Malt1-defizienten BM-DCs nachzuweisen, stimulierten wir BM-DCs der drei Genotypen mit den TLR-Liganden PGN (TLR2), LPS (TLR4) und CpG (TLR9). Die gemessene Menge an TNF- α war zwischen den drei Genotypen vergleichbar (Abbildung 8), so dass wir einen generellen Funktionsdefekt ausschließen konnten. Somit kann man zusammenfassen, dass der Signalkomplex aus Bcl10 und Malt1 innerhalb des Dectin-1-vermittelten Signalweges wichtig ist. Zudem konnten wir in unseren Experimenten keine Beteiligung von Bcl10 und Malt1 an den TLR2-, TLR4- und TLR9-Signalwegen nachweisen, wohingegen Liu *et al.* publizierten, dass Bcl10-defiziente Makrophagen einen Defekt in der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung aufweisen (Liu et al., 2004). Während Liu *et al.* den LPS-stimulierten TLR4-Signalweg in der Makrophagenzelllinie RAW264.7, die mit einem siRNA-Konstrukt gegen Bcl10 transfiziert wurde, untersuchten, wurden in unseren Untersuchungen primäre DCs verwendet. Inwieweit Unterschiede in den Signalwegen von Makrophagen und dendritischen Zellen bestehen, wurde in diesem Zusammenhang bisher nicht erforscht. Bei RAW264.7 Zellen handelt es sich zudem um eine murine Zelllinie, die durch die Transformation mit dem murinen Abelson-

Leukämievirus immortalisiert wurde. Aufgrund dieser Transformation kann diese Zelllinie weitere Defekte aufweisen, die in einer primären Zelle nicht vorhanden sind, wodurch man die unterschiedlichen Reaktionen der Zellen auf die Stimulation mit LPS nach dem Ausschalten von Bcl10 erklären könnte.

Neben Bcl10 und Malt1 wurde als weiteres Signalmolekül im Dectin-1-vermittelten Signalweg Card9 untersucht (Gross et al., 2006). Card9 kann direkt mit der N-terminalen CARD von Bcl10 interagieren (Bertin et al., 2000). Anhand von Überexpressionsstudien wurde gezeigt, dass Card9 im Dectin-1-Signalweg oberhalb von Bcl10 und Malt1 liegt (Gross et al., 2006). Ein bereits bekanntes Signalmolekül im Dectin-1-medierten Signalweg ist Syk, das an das ITAM am zytoplasmatischen Ende von Dectin-1 binden kann (Rogers et al., 2005). Die Signalkomponenten Dectin-1/Syk steuern in myeloischen Zellen verschiedene zelluläre Funktionen, unter anderem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Brown, 2006). Um die Aktivierung von NF- κ B nach Dectin-1 Stimulation mit Zymosan in Bcl10- und Malt1-defizienten DCs zu untersuchen, analysierten wir die Translokation des NF- κ B-Familienmitgliedes RelA in den Nucleus mittels Immunfluoreszenzen. Hierbei zeigte sich, dass die Aktivierung von RelA sowohl in den Bcl10- als auch in den Malt1-defizienten DCs nach Stimulation mit Zymosan gestört ist, während nach Stimulation mit LPS eine normale RelA-Aktivierung beobachtet wurde (Abbildung 9). Diese Ergebnisse zeigen, dass Bcl10 und Malt1 in der Dectin-1-vermittelten Aktivierung von NF- κ B in dendritischen Zellen von zentraler Bedeutung sind.

Neben NF- κ B sind weitere Transkriptionsfaktoren zur Aufrechterhaltung einer suffizienten Immunantwort wichtig und notwendig. Einige dieser Transkriptionsfaktoren sind solche, die durch die Mitglieder der Mitogen-aktivierten Proteinkinasefamilie (mitogen-activated protein kinase, MAPK) p38, Jun N-terminale Kinasen (Jnk) und die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen (extracellular signal-regulated kinases, Erk) gesteuert werden. Die MAP Kinasen regulieren in dendritischen Zellen nach Stimulation durch zellulären Stress, inflammatorische Zytokine oder Wachstumsfaktoren die Zellreifung und nachfolgende Zytokinsekretion (Nakahara et al., 2006). Über die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine lösen dendritische Zellen die adaptive Immunantwort aus (Agrawal et al., 2003). Eine dieser adaptiven Immunantworten beruht auf der Differenzierung von Th17 Zellen (Gutcher und Becher, 2007). Naive CD4⁺ T-Zellen differenzieren dann zu Th17 Zellen, wenn sie mit dem transformierenden Transkriptionsfaktor β (transforming growth factor- β , TGF- β) und IL-6 in Berührung kommen (Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). Th17 Zellen vermitteln die pro-inflammatorischen Effekte über die Produktion der Zytokine IL-17, IL-22, IL-26 und

TNF- α (Chung et al., 2006; Stockinger und Veldhoen, 2007). Eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Erhaltung von Autoimmunerkrankungen kommt Th17 Zellen durch die Entdeckung zu, dass Mäuse, die TGF- β überexprimieren und somit eine größere Anzahl an Th17 Zellen generieren, eine Exazerbation der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis, einem experimentellen Modell für Multiple Sklerose, aufweisen (Bettelli et al., 2006). Inzwischen wurde gezeigt, dass Th17 Zellen essentielle Mediatoren der Pathologie verschiedener Autoimmunerkrankungen, einschließlich der Rheumatoiden Arthritis, des Morbus Crohn und des systemischen Lupus erythematoses, sind (Stockinger und Veldhoen, 2007). Neben der Beteiligung an der Ausprägung von Autoimmunerkrankungen ist die primäre Funktion von Th17 Zellen jedoch die IL-17-induzierte Mobilisierung und *de novo* Generierung von Neutrophilen im Zuge der Pathogenbekämpfung (Fossiez et al., 1998). LeibundGut-Landmann *et al.* haben gezeigt, dass die Reifung von dendritischen Zellen zur Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF und IL-23 führt, weshalb die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu Th17 Zellen über die Aktivierung von Dectin-1 via Syk und Card9 reguliert werden kann (LeibundGut-Landmann et al., 2007). Ob dieser Card9-regulierte Signalweg auch über Bcl10 und Malt1 vermittelt wird und ob Bcl10 und Malt1 damit an der Regulation von Autoimmunerkrankungen beteiligt sind, kann in weiteren Studien geklärt werden.

4.3 Bcl10 und Malt1 als Signalmoleküle bei fungalen Infektionen

Der Dectin-1-Ligand Zymosan ist ein Zellwandbestandteil der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, der im Hauptanteil aus β -Glukanen besteht. Um zu bestätigen, dass die präsentierten Ergebnisse nicht auf Zymosan beschränkt sind, sondern auf weitere Pilze übertragbar sind, stimulierten wir dendritische Zellen mit Hitze-inaktivierten *Candida albicans*, einem Erreger dessen klinisches Spektrum von gut therapierbaren mucokutanen Infektionen bis zu lebensbedrohlichen systemischen Infektionen reicht (Romani, 2004). Die Produktion der Zytokine TNF- α , IL-2 und IL-10 in Bcl10- und Malt1-defizienten DCs zeigte sich nach Stimulation mit inaktivierten *Candida albicans* defekt (Abbildung 10), womit wir zeigen konnten, dass die nach Dectin-1 Stimulation mit Zymosan gesehenen Defekte mit *Candida albicans* reproduzierbar sind. In zwei unabhängigen Studien wurde die Funktion von Dectin-1 anhand von Dectin-1-defizienten Mäusen untersucht (Saijo et al., 2007; Taylor et al., 2007). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stellen dar, dass Dectin-1 für die Erkennung von β -Glukanen wie Zymosan notwendig ist und auch zum Teil die Abwehrmechanismen gegen fungale Infektionen kontrollieren kann. Zur Erkennung fungaler Erreger durch

dendritische Zellen zeigte sich Dectin-1 jedoch teilweise entbehrlich, was impliziert, dass noch weitere Rezeptoren, wie zum Beispiel DC-SIGN oder Dectin-2, in diesem Zusammenhang untersucht werden sollten (Cambi et al., 2003).

4.4 Potentielle Beteiligung von Bcl10 und Malt1 in der Signaltransduktion von weiteren ITAM-Rezeptoren

Neben Dectin-1 gibt es eine Vielzahl an Rezeptoren, die ein ITAM zur Signaltransduktion benutzen (Underhill und Goodridge, 2007). Ein ITAM-Rezeptor, dessen Signaltransduktion auf eine Beteiligung von Bcl10 und Malt1 untersucht wurde, ist der Fc ϵ RI, dessen Aktivierung durch IgE die Mastzelldegranulation mit nachfolgender Ausschüttung pro-inflammatorischer Leukotriene und Zytokine und deren *de novo* Synthese auslöst (Rivera, 2002; Siraganian, 2003). Klemm *et al.* haben gezeigt, dass Bcl10 und Malt1 Schlüsselregulatoren innerhalb der Mastzellsignaltransduktion sind (Klemm et al., 2006). Als essentielle Vermittler der Fc ϵ RI-abhängigen Mastzellaktivierung trennen Bcl10 und Malt1 selektiv die NF- κ B-induzierte pro-inflammatorische Zytokinproduktion von der Mastzelldegranulation und Leukotriensynthese. Ein weiterer Rezeptor der Familie der Fc-Rezeptoren, der nahe verwandt mit Fc ϵ RI ist, ist Fc γ R. Sowohl Fc ϵ RI als auch Fc γ R leiten ihre Signale über die γ Kette weiter, so dass eine Untersuchung der Fc γ R-vermittelten Signaltransduktion bezüglich einer Beteiligung von Bcl10 und Malt1 interessant wäre.

Neben den Rezeptoren, die über ein eigenes ITAM verfügen, gibt es Rezeptoren, welche in Verbindung mit ITAM-enthaltenden Signalketten die Zellaktivierung regulieren. Zu dieser Gruppe zählen die Oberflächenrezeptoren der NK Zellen, die transformierte oder infizierte Zellen erkennen und bekämpfen (Kirwan und Burshtyn, 2007). Prototypen für aktivierende NK Zell-Rezeptoren sind NK1.1, Ly49D, Ly49H und NKG2D, die mit den ITAM-enthaltenden Signalketten DAP-12, Fc γ oder CD3 ζ assoziieren können (Lanier, 2003). Die Untersuchung von NK Zellen aus Bcl10-, Malt1-, Carma1- und Card9-defizienten Mäusen konnten zeigen, dass der Komplex aus Carma1/Bcl10/Malt1 von verschiedenen NK Zell-Rezeptoren zur Signalweiterleitung genutzt wird und unabhängig von Card9 ist (Gross et al., 2008). Diese Publikationen geben eindeutige Hinweise, dass Bcl10 und Malt1 an weiteren ITAM-nutzenden Rezeptorsignalwegen beteiligt sind.

Außer den bereits beschriebenen ITAM-nutzenden Rezeptoren gibt es in der Familie der C-Typ Lectin Rezeptoren, zu der auch Dectin-1 gezählt wird, weitere Rezeptoren, die auf myeloischen Zellen exprimiert werden, welche jedoch bezüglich ihrer Liganden und physiologischen Funktion noch unzulänglich charakterisiert sind (Brown, 2008). Eine Gruppe

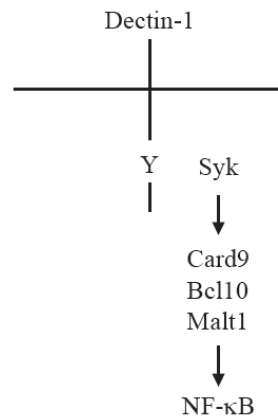
von sechs solchen sehr ähnlichen Rezeptor-kodierten Genen ist in der Nachbarschaft zum Dectin-1 Gen lokalisiert. Sie weisen eine hohe Sequenzhomologie auf, so dass die Vermutung nahe liegt, dass ihre Entstehung auf die Vervielfältigung eines gemeinsamen Stammgenlocus zurückzuführen ist (Brown, 2006). Vier dieser Gene, *Clec2*, *Clec9a*, *Clec12a* und *Clec12b*, kodieren Proteine, die in ihrem zytoplasmatischen Anteil ein ITAM tragen. Die genannten C-Typ Lectin Rezeptoren sind bisher nur wenig erforscht, aufgrund ihrer Homologien zu Dectin-1 ist es jedoch vorstellbar, dass auch sie ähnlich wie Dectin-1 als PRR funktionieren. In weiteren Studien kann untersucht werden, ob in diesen noch undefinierten Signalwegen Card9/Bcl10/Malt1 eine Rolle spielen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das menschliche Immunsystem wird in zwei grundsätzlich unterschiedliche Systeme unterteilt: das angeborene und das erworbene Immunsystem. Dringen Pathogene in den Organismus ein, treffen sie zunächst auf Verteidigungsmechanismen des angeborenen Immunsystems. Zu diesen Verteidigungsmechanismen gehören die Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen, die ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunantwort darstellen. Die hier präsentierte Arbeit beschäftigte sich mit der Rolle von Bcl10 und Malt1 in der angeborenen Immunantwort anhand der Untersuchung dendritischer Zellen. Zunächst wurde die Differenzierung dendritischer Zellen von Bcl10- und Malt1-defizienten Mäusen untersucht und gezeigt, dass Bcl10 und Malt1 für die Entwicklung von der Knochenmarksvorläuferzelle zur dendritischen Zelle nicht benötigt werden (Abbildung 6). Dendritische Zellen erkennen Pathogene über PRRs. Ein Schlüsselrezeptor für die Erkennung von Hefen ist der β -Glukan Rezeptor Dectin-1, der zur Signalweiterleitung ein zytoplasmatisches ITAM benutzt. Genauere Untersuchungen dieses Signalweges, der in vielen Studien zur Untersuchung der molekularen Hintergründe fungaler Infektionen als Modell dient, ergaben, dass Bcl10 und Malt1 essentielle Signalmoleküle unterhalb von Dectin-1 sind (Abbildung 7). Um einen generellen Funktionsdefekt der Bcl10- und Malt1-defizienten DCs auszuschließen, stimulierten wir die Zellen über verschiedene TLR Rezeptoren, die ebenfalls von dendritischen Zellen exprimiert werden. Die Stimulation mit den TLR-Liganden PGN (TLR2), LPS (TLR4) und CpG (TLR9) ergab in allen drei Genotypen eine vergleichbare Menge an TNF- α (Abbildung 8). Durch dieses Ergebnis konnte ein genereller Funktionsdefekt ausgeschlossen werden. Da über die Aktivierung von Dectin-1 unter anderem der Transkriptionsfaktor NF- κ B gesteuert wird, analysierten wir die Translokation des NF- κ B-Familienmitgliedes RelA in den Nucleus mittels Immunfluoreszenzen. Hierbei zeigte sich, dass die Aktivierung von RelA sowohl in den Bcl10- als auch in den Malt1-defizienten DCs nach Stimulation mit Zymosan gestört ist (Abbildung 9). Um nachzuweisen, dass die gezeigten Defekte nicht nur spezifisch sind für Zymosan, einen Zellwandbestandteil der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, sondern auch auf Pilze übertragbar sind, wurden die Stimulationsexperimente mit Hitze-inaktivierten *Candida albicans* durchgeführt (Abbildung 10). Die nach Stimulation mit Zymosan beschriebenen Defekte in der Zytokinproduktion konnten mit *Candida albicans* bestätigt werden.

Durch die hier präsentierten Ergebnisse wird die Rolle von Bcl10 und Malt1 in der angeborenen Immunantwort genauer charakterisiert. Bcl10 und Malt1 konnten gemeinsam mit Card9 dem Dectin-1-vermittelten Signalweg zugeordnet werden. Stimulationssignale

werden von Dectin-1 über Syk und Card9/Bcl10/Malt1 weitergeleitet und führen zur Aktivierung von NF-κB (Gross et al., 2006) (Abbildung 11).



nach Gross *et al.*, 2006

Abbildung 11 Vereinfachte Darstellung des Dectin-1-Signalweges. Erklärung siehe Text.

Die klinische Relevanz fungaler Infektionen hat in den vergangenen Jahren aufgrund der wachsenden Anzahl immunsupprimierter Patienten, die vor allem von HIV-Infizierten, Transplantatempfängern und Patienten mit Krebs gebildet wird, zugenommen (Clark und Hajjeh, 2002). Dass die Bedrohung, die von Pilzinfektionen ausgeht, noch weiter ansteigt, zeigte sich in dem Auftreten der Aspergillose bei Patienten mit einem schweren akuten respiratorischen Syndrom (Wang et al., 2003). Um die Pathogenese solcher Erkrankungen besser zu verstehen, ist es hilfreich, die Signalwege, die bei der Bekämpfung fungaler Pathogene aktiviert werden, weiter aufzuschlüsseln.

Für zahlreiche Infektionserkrankungen wurde gezeigt, dass sie über TLR Rezeptoren erkannt werden (Bellocchio et al., 2004; Villamon et al., 2004). An der Erkennung von Pathogenen sind neben den TLR Rezeptoren eine Vielzahl an C-Typ Lectin Rezeptoren beteiligt, die Signale über ITAMs weiterleiten. Ob Bcl10 und Malt1 an der Signaltransduktion von weiteren ITAM-Rezeptoren beteiligt sind, kann in weiteren Studien geklärt werden. Eine wichtige Rolle in Infektions- und Autoimmunerkrankungen hat die immunologische Antwort der Th17 Zellen (Amadi-Obi et al., 2007; Veldhoen et al., 2006). Da die Th17 Zellen auch an der Bekämpfung von Pilzen beteiligt sind, sollte eine Rolle von Bcl10 und Malt1 in der Th17-medierten Immunantwort untersucht werden. Damit könnte auch eine Beteiligung von Bcl10 und Malt1 an Autoimmunerkrankungen gezeigt werden.

Literaturverzeichnis

- Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* 17, 593-623.
- Agrawal, A., Eastman, Q.M., and Schatz, D.G. (1998). Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature* 394, 744-751.
- Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van Dyke, T., and Pulendran, B. (2003). Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* 171, 4984-4989.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature reviews* 4, 499-511.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.
- Aliprantis, A.O., Yang, R.B., Mark, M.R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J.D., Klimpel, G.R., Godowski, P., and Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science (New York, NY)* 285, 736-739.
- Amadi-Obi, A., Yu, C.R., Liu, X., Mahdi, R.M., Clarke, G.L., Nussenblatt, R.B., Gery, I., Lee, Y.S., and Egwuagu, C.E. (2007). TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nature medicine* 13, 711-718.
- Anderson, K.V. (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response. *Current opinion in immunology* 12, 13-19.
- Ariizumi, K., Shen, G.L., Shikano, S., Xu, S., Ritter, R., 3rd, Kumamoto, T., Edelbaum, D., Morita, A., Bergstresser, P.R., and Takashima, A. (2000). Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *The Journal of biological chemistry* 275, 20157-20167.
- Austyn, J.M., Kupiec-Weglinski, J.W., Hankins, D.F., and Morris, P.J. (1988). Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Homing to T cell-dependent areas of spleen, and binding within marginal zone. *The Journal of experimental medicine* 167, 646-651.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* 18, 767-811.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Bell, D., Young, J.W., and Banchereau, J. (1999). Dendritic cells. *Advances in immunology* 72, 255-324.
- Bellocchio, S., Montagnoli, C., Bozza, S., Gaziano, R., Rossi, G., Mambula, S.S., Vecchi, A., Mantovani, A., Levitz, S.M., and Romani, L. (2004). The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol* 172, 3059-3069.
- Bertin, J., Guo, Y., Wang, L., Srinivasula, S.M., Jacobson, M.D., Poyet, J.L., Merriam, S., Du, M.Q., Dyer, M.J., Robison, K.E., *et al.* (2000). CARD9 is a novel caspase recruitment domain-containing protein that interacts with BCL10/CLAP and activates NF-kappa B. *The Journal of biological chemistry* 275, 41082-41086.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
- Brightbill, H.D., Libraty, D.H., Krutzik, S.R., Yang, R.B., Belisle, J.T., Bleharski, J.R., Maitland, M., Norgard, M.V., Plevy, S.E., Smale, S.T., *et al.* (1999). Host defense

- mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* (New York, NY 285, 732-736.
- Brown, G.D. (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature reviews* 6, 33-43.
- Brown, G.D. (2008). Sensing necrosis with Mincle. *Nature immunology* 9, 1099-1100.
- Brown, G.D., and Gordon, S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 413, 36-37.
- Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S., and Gordon, S. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *The Journal of experimental medicine* 197, 1119-1124.
- Cambi, A., Gijzen, K., de Vries, J.M., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G.J., Netea, M.G., Kullberg, B.J., Romani, L., and Figdor, C.G. (2003). The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *European journal of immunology* 33, 532-538.
- Chen, G., and Goeddel, D.V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* (New York, NY 296, 1634-1635.
- Chung, Y., Yang, X., Chang, S.H., Ma, L., Tian, Q., and Dong, C. (2006). Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes. *Cell research* 16, 902-907.
- Clark, T.A., and Hajjeh, R.A. (2002). Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Current opinion in infectious diseases* 15, 569-574.
- Coban, C., Ishii, K.J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., *et al.* (2005). Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *The Journal of experimental medicine* 201, 19-25.
- Costanzo, A., Guiet, C., and Vito, P. (1999). c-E10 is a caspase-recruiting domain-containing protein that interacts with components of death receptors signaling pathway and activates nuclear factor-kappaB. *The Journal of biological chemistry* 274, 20127-20132.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* (New York, NY 303, 1529-1531.
- Du, M.Q., Peng, H., Liu, H., Hamoudi, R.A., Diss, T.C., Willis, T.G., Ye, H., Dogan, A., Wotherspoon, A.C., Dyer, M.J., *et al.* (2000). BCL10 gene mutation in lymphoma. *Blood* 95, 3885-3890.
- Engering, A.J., Cella, M., Fluitsma, D., Brockhaus, M., Hoefsmit, E.C., Lanzavecchia, A., and Pieters, J. (1997). The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *European journal of immunology* 27, 2417-2425.
- Fearon, D.T., and Locksley, R.M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* (New York, NY 272, 50-53.
- Fossiez, F., Banchereau, J., Murray, R., Van Kooten, C., Garrone, P., and Lebecque, S. (1998). Interleukin-17. *International reviews of immunology* 16, 541-551.
- Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., and Underhill, D.M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *The Journal of experimental medicine* 197, 1107-1117.
- Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology* 16, 225-260.

- Gillis, S., and Smith, K.A. (1977). Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature* 268, 154-156.
- Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schafer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., Forster, I., and Ruland, J. (2006). Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 442, 651-656.
- Gross, O., Grupp, C., Steinberg, C., Zimmermann, S., Strasser, D., Hanneschlager, N., Reindl, W., Jonsson, H., Huo, H., Littman, D.R., *et al.* (2008). Multiple ITAM-coupled NK-cell receptors engage the Bcl10/Malt1 complex via Carma1 for NF-kappaB and MAPK activation to selectively control cytokine production. *Blood* 112, 2421-2428.
- Gutcher, I., and Becher, B. (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *The Journal of clinical investigation* 117, 1119-1127.
- Hart, D.N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90, 3245-3287.
- Hashimoto, C., Hudson, K.L., and Anderson, K.V. (1988). The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-1103.
- Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., *et al.* (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *European journal of immunology* 33, 2987-2997.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science (New York, NY)* 303, 1526-1529.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature immunology* 3, 196-200.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., *et al.* (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., and Ezekowitz, R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science (New York, NY)* 284, 1313-1318.
- Hofmann, K., Bucher, P., and Tschopp, J. (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends in biochemical sciences* 22, 155-156.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162, 3749-3752.
- Inaba, K., Metlay, J.P., Crowley, M.T., and Steinman, R.M. (1990). Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *The Journal of experimental medicine* 172, 631-640.
- Inaba, K., Witmer-Pack, M., Inaba, M., Hathcock, K.S., Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley, P.S., Ikehara, S., *et al.* (1994). The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *The Journal of experimental medicine* 180, 1849-1860.

- Janeway, C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 54 Pt 1, 1-13.
- Janeway, C.A., Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology today* 13, 11-16.
- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (1998). Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* 10, 349-350.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport M., Shlomchik M. (2001). *Immunobiology*, Vol fifth edition.
- Jiang, W., Swiggard, W.J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375, 151-155.
- Jun, J.E., and Goodnow, C.C. (2003). Scaffolding of antigen receptors for immunogenic versus tolerogenic signaling. *Nature immunology* 4, 1057-1064.
- Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A.M., Wagner, H., Lipford, G., and Bauer, S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature immunology* 3, 499.
- Kane, L.P., Lin, J., and Weiss, A. (2002). It's all Rel-ative: NF-kappaB and CD28 costimulation of T-cell activation. *Trends in immunology* 23, 413-420.
- Kataoka, K., Muta, T., Yamazaki, S., and Takeshige, K. (2002). Activation of macrophages by linear (1right-arrow3)-beta-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *The Journal of biological chemistry* 277, 36825-36831.
- Kirwan, S.E., and Burshtyn, D.N. (2007). Regulation of natural killer cell activity. *Current opinion in immunology* 19, 46-54.
- Klemm, S., Gutermuth, J., Hultner, L., Sparwasser, T., Behrendt, H., Peschel, C., Mak, T.W., Jakob, T., and Ruland, J. (2006). The Bcl10-Malt1 complex segregates Fc epsilon RI-mediated nuclear factor kappa B activation and cytokine production from mast cell degranulation. *The Journal of experimental medicine* 203, 337-347.
- Koseki, T., Inohara, N., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Hottiger, M.O., Nabel, G.J., and Nunez, G. (1999). CIPER, a novel NF kappaB-activating protein containing a caspase recruitment domain with homology to Herpesvirus-2 protein E10. *The Journal of biological chemistry* 274, 9955-9961.
- Krug, A., French, A.R., Barchet, W., Fischer, J.A., Dzionek, A., Pingel, J.T., Orihuela, M.M., Akira, S., Yokoyama, W.M., and Colonna, M. (2004). TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21, 107-119.
- Lanier, L.L. (2003). Natural killer cell receptor signaling. *Current opinion in immunology* 15, 308-314.
- LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M.J., Osorio, F., Slack, E.C., Tsoni, S.V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G.D., Ruland, J., *et al.* (2007). Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nature immunology* 8, 630-638.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
- Liu, Y., Dong, W., Chen, L., Xiang, R., Xiao, H., De, G., Wang, Z., and Qi, Y. (2004). BCL10 mediates lipopolysaccharide/toll-like receptor-4 signaling through interaction with Pellino2. *The Journal of biological chemistry* 279, 37436-37444.

- Lucas, P.C., Yonezumi, M., Inohara, N., McAllister-Lucas, L.M., Abazeed, M.E., Chen, F.F., Yamaoka, S., Seto, M., and Nunez, G. (2001). Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 276, 19012-19019.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., and Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 198, 513-520.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441, 231-234.
- McWilliam, A.S., Napoli, S., Marsh, A.M., Pemper, F.L., Nelson, D.J., Pimm, C.L., Stumbles, P.A., Wells, T.N., and Holt, P.G. (1996). Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. *The Journal of experimental medicine* 184, 2429-2432.
- McWilliam, A.S., Nelson, D., Thomas, J.A., and Holt, P.G. (1994). Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *The Journal of experimental medicine* 179, 1331-1336.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews* 1, 135-145.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current opinion in immunology* 9, 4-9.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science (New York, NY)* 296, 298-300.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Muzio, M., Natoli, G., Saccani, S., Levrero, M., and Mantovani, A. (1998). The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *The Journal of experimental medicine* 187, 2097-2101.
- Nakahara, T., Moroi, Y., Uchi, H., and Furue, M. (2006). Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *Journal of dermatological science* 42, 1-11.
- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13766-13771.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., *et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science (New York, NY)* 282, 2085-2088.
- Reis e Sousa, C., Stahl, P.D., and Austyn, J.M. (1993). Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *The Journal of experimental medicine* 178, 509-519.
- Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C.L., Gold, M.R., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1998). Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *The Journal of experimental medicine* 188, 2175-2180.
- Rivera, J. (2002). Molecular adapters in Fc(epsilon)RI signaling and the allergic response. *Current opinion in immunology* 14, 688-693.

- 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., *et al.* (2005). Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* *22*, 507-517.
- Romani, L. (2004). Immunity to fungal infections. *Nature reviews* *4*, 1-23.
- Ruland, J., Duncan, G.S., Elia, A., del Barco Barrantes, I., Nguyen, L., Plyte, S., Millar, D.G., Bouchard, D., Wakeham, A., Ohashi, P.S., *et al.* (2001). Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell* *104*, 33-42.
- Ruland, J., Duncan, G.S., Wakeham, A., and Mak, T.W. (2003). Differential requirement for Malt1 in T and B cell antigen receptor signaling. *Immunity* *19*, 749-758.
- Sagaert, X., Laurent, M., Baens, M., Wlodarska, I., and De Wolf-Peeters, C. (2006). MALT1 and BCL10 aberrations in MALT lymphomas and their effect on the expression of BCL10 in the tumour cells. *Mod Pathol* *19*, 225-232.
- Saijo, S., Fujikado, N., Furuta, T., Chung, S.H., Kotaki, H., Seki, K., Sudo, K., Akira, S., Adachi, Y., Ohno, N., *et al.* (2007). Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nature immunology* *8*, 39-46.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of experimental medicine* *182*, 389-400.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine* *179*, 1109-1118.
- Siraganian, R.P. (2003). Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. *Current opinion in immunology* *15*, 639-646.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Lin, J.H., Poyet, J.L., Fernandes-Alnemri, T., Tsichlis, P.N., and Alnemri, E.S. (1999). CLAP, a novel caspase recruitment domain-containing protein in the tumor necrosis factor receptor pathway, regulates NF-kappaB activation and apoptosis. *The Journal of biological chemistry* *274*, 17946-17954.
- Steele, C., Marrero, L., Swain, S., Harmsen, A.G., Zheng, M., Brown, G.D., Gordon, S., Shellito, J.E., and Kolls, J.K. (2003). Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *The Journal of experimental medicine* *198*, 1677-1688.
- Steinman, R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual review of immunology* *9*, 271-296.
- Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2007). Differentiation and function of Th17 T cells. *Current opinion in immunology* *19*, 281-286.
- Takeda, K., and Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology* *17*, 1-14.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* *11*, 443-451.
- Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Muhlradt, P.F., and Akira, S. (2000). Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* *164*, 554-557.

- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L., and Akira, S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* *169*, 10-14.
- Taylor, P.R., Brown, G.D., Reid, D.M., Willment, J.A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., and Wong, S.Y. (2002). The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* *169*, 3876-3882.
- Taylor, P.R., Tsoni, S.V., Willment, J.A., Dennehy, K.M., Rosas, M., Findon, H., Haynes, K., Steele, C., Botto, M., Gordon, S., *et al.* (2007). Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nature immunology* *8*, 31-38.
- Thome, M. (2004). CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nature reviews* *4*, 348-359.
- Thome, M., Martinon, F., Hofmann, K., Rubio, V., Steiner, V., Schneider, P., Mattmann, C., and Tschopp, J. (1999). Equine herpesvirus-2 E10 gene product, but not its cellular homologue, activates NF-kappaB transcription factor and c-Jun N-terminal kinase. *The Journal of biological chemistry* *274*, 9962-9968.
- Underhill, D.M., and Goodridge, H.S. (2007). The many faces of ITAMs. *Trends in immunology* *28*, 66-73.
- Underhill, D.M., Rosnagle, E., Lowell, C.A., and Simmons, R.M. (2005). Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* *106*, 2543-2550.
- Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., and Dixit, V.M. (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular cell* *6*, 961-967.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* *24*, 179-189.
- Villamon, E., Gozalbo, D., Roig, P., Murciano, C., O'Connor, J.E., Fradelizi, D., and Gil, M.L. (2004). Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for murine resistance to *Candida albicans* and is critically involved in *Candida* -induced production of cytokines. *Eur Cytokine Netw* *15*, 263-271.
- Viriyakosol, S., Fierer, J., Brown, G.D., and Kirkland, T.N. (2005). Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infection and immunity* *73*, 1553-1560.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation* *10*, 45-65.
- Wang, H., Ding, Y., Li, X., Yang, L., Zhang, W., and Kang, W. (2003). Fatal aspergillosis in a patient with SARS who was treated with corticosteroids. *The New England journal of medicine* *349*, 507-508.
- Watson, J. (1979). Continuous proliferation of murine antigen-specific helper T lymphocytes in culture. *The Journal of experimental medicine* *150*, 1510-1519.
- Watson, J., Gillis, S., Marbrook, J., Mochizuki, D., and Smith, K.A. (1979). Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. I. Purification of a class of murine lymphokines. *The Journal of experimental medicine* *150*, 849-861.
- Willis, T.G., Jadayel, D.M., Du, M.Q., Peng, H., Perry, A.R., Abdul-Rauf, M., Price, H., Karran, L., Majekodunmi, O., Wlodarska, I., *et al.* (1999). Bcl10 is involved in

- t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* 96, 35-45.
- Willment, J.A., Lin, H.H., Reid, D.M., Taylor, P.R., Williams, D.L., Wong, S.Y., Gordon, S., and Brown, G.D. (2003). Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. *J Immunol* 171, 4569-4573.
- Wotherspoon, A.C. (2002). Extragastic MALT lymphoma. *Gut* 51, 148-149.
- Yan, M., Lee, J., Schilbach, S., Goddard, A., and Dixit, V. (1999). mE10, a novel caspase recruitment domain-containing proapoptotic molecule. *The Journal of biological chemistry* 274, 10287-10292.
- Young, S.H., Ye, J., Frazer, D.G., Shi, X., and Castranova, V. (2001). Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha production in 1->3-beta-glucan (zymosan)-activated macrophages. *The Journal of biological chemistry* 276, 20781-20787.
- Zhang, Q., Siebert, R., Yan, M., Hinzmann, B., Cui, X., Xue, L., Rakestraw, K.M., Naeve, C.W., Beckmann, G., Weisenburger, D.D., *et al.* (1999). Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nature genetics* 22, 63-68.
- Zhou, L.J., and Tedder, T.F. (1996). CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 2588-2592.

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1	Der Lebenszyklus dendritischer Zellen (DC).....	10
Abbildung 2	Die Struktur des Toll-like Rezeptors im Vergleich mit dem Interleukin-1 Rezeptor.....	13
Abbildung 3	Die TLR/IL-1R-Signalkaskade	15
Abbildung 4	Die Struktur von Dectin-1	16
Abbildung 5	Die Dectin-1-vermittelte Signaltransduktion	18
Abbildung 6	Normale Differenzierung der Bcl10 ^{-/-} und Malt1 ^{-/-} BM-DCs im Vergleich mit wt BM-DCs	25
Abbildung 7	Bcl10 und Malt1 sind notwendig für die Zymosan-induzierte Zytokinproduktion.....	26
Abbildung 8	Normale Zytokininduktion in Bcl10 ^{-/-} und Malt1 ^{-/-} BM-DCs nach TLR-Stimulation	27
Abbildung 9	Der spezifische Defekt in der Zymosan-induzierten NF-κB-Aktivierung in Bcl10 ^{-/-} und Malt1 ^{-/-} BM-DCs.....	28
Abbildung 10	<i>Candida albicans</i> -induzierte Produktion von TNF-α, IL-2 oder IL-10 in Bcl10 ^{-/-} und Malt1 ^{-/-} BM-DCs	29
Abbildung 11	Vereinfachte Darstellung des Dectin-1-Signalweges.....	37

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1	Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden	14
-----------	--	----

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Katrin Marie Finger
Geburtsdatum: 01.01.1981
Geburtsort: Ingolstadt
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul- und Berufsausbildung

1987 - 1991 Besuch der Grundschule im Lindenkreuz, Manching
1991 - 2000 Besuch des Gnadenthal-Gymnasiums Ingolstadt mit
abschließendem Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
Okt. 2000- Sept. 2002 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität
Halle/Saale und Bestehen des Physikums
Sept. 2002 - Aug. 2003 Aufenthalt in Südamerika
Okt. 2003 – Nov. 2007 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität
München
November 2007 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Approbation als Ärztin
Seit Januar 2008 Assistenzärztin an der III. Medizinischen Klinik für Hämatologie
und internistische Onkologie des Klinikums rechts der Isar in
München, tätig in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Ruland

Publikationsliste

Gross O, Gewies A, Finger K, Schäfer M, Sparwasser T, Peschel C, Förster I, Ruland J.
Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. Nature. 2006
Aug 10;442(7103):651-6.

Werninghaus K, Babiak A, Gross O, Hölscher C, Dietrich H, Agger EM, Mages J, Mocsai A,
Schoenen H, Finger K, Nimmerjahn F, Brown GD, Kirschning C, Heit A, Andersen P,
Wagner H, Ruland J, Lang R. *Adjuvanticity of a synthetic cord factor analogue for subunit
Mycobacterium tuberculosis vaccination requires FcRgamma-Syk-Card9-dependent innate
immune activation*. J Exp Med. 2009 Jan 16;206(1):89-97.

Danksagung

Danken möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel, der es mir ermöglichte, diese Arbeit in seiner Klinik durchzuführen und nach deren Abschluss als Wissenschaftlerin in seiner Klinik tätig zu sein.

Mein Dank gilt besonders Herrn PD Dr. med. Jürgen Ruland, der mir mit der Aufnahme als medizinische Doktorandin in seine Arbeitsgruppe die Möglichkeit gab, die Wissenschaft zu entdecken und damit meine forschende Neugier geweckt hat.

Bei allen Mitarbeitern der AG Ruland bedanke ich mich für die gute Zeit und das nette Zusammenarbeiten im Labor, vor allem möchte ich Olaf Groß und Andreas Gewies für jegliche Hilfe und Unterstützung danken.

Meine medizinische Mitstreiterin Stefanie Weiss wurde mir zur Weggefährtin in guten und schlechten Zeiten, vielen Dank dafür.

Ein ganz besonderer Dank gilt außerdem Christian Süß, Mathias Schmid und Alexander Illmann, ohne die eine Durchführung dieser Doktorarbeit neben dem Medizinstudium nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank an Marc Schwenker für Geduld, Unterstützung und Motivation beim abschließenden Schreiben.

Inbesondere danke ich meinen Eltern Maria und Richard Finger
und der Großfamilie Finger.