



**Der Einfluss von Rho GTPasen auf die
Toll-Like Rezeptor (TLR) –
induzierte Zytokinproduktion
von murinen Knochenmarkmakrophagen**

Dissertation

**zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs Biologie der Universität Osnabrück**

vorgelegt von

Anette Schulz

aus Rostock

Osnabrück, 2014

Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise entgeltlich / unentgeltlich geholfen.

1. Konfokale Mikroskopie: Christoph Guggenberger
2. Herstellung von pseudoprimären immortalisierten Knochenmarkszellen: Stefan Wölke
3. Überarbeitung und Korrektur der vorliegenden Arbeit: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Weitere Personen waren an der inhaltlichen materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....
(Ort, Datum)

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1. Einleitung	5
1.1. Immunität	5
1.1.1 Angeborene Immunität	5
1.2 Zellen der angeborenen Immunität	7
1.2.1 Monozyten / Makrophagen	7
1.2.2 Dendritische Zellen vs. Makrophagen und Granulozyten	8
1.3 Rezeptoren der angeborenen Immunität	9
1.3.1 Toll-Like Rezeptoren	10
1.3.2 Toll-Like Rezeptorsignalwege	12
1.3.3 Überlagerungen von TLR-Signalwegen und G-Protein-vermittelten Signalwegen	15
1.4 Zytokine	16
1.4.1 Zytokinfamilie I	16
1.4.1.1 Interleukin-6	16
1.4.1.2 Interleukin-12	17
1.4.2 Zytokinfamilie II	17
1.4.2.1 Interleukin-10	18
1.4.3 TNF Zytokinfamilie	19
1.4.3.1 TNF α	19
1.5 Rho GTPasen	20
1.5.1 Rho GTPasen in TLR-Signalwegen	23
1.5.2 Rho GTPasen und reaktive Sauerstoff-Intermediate (ROI) in TLR-induzierter NF κ B Aktivierung und Zytokinsekretion	25
1.6 Konditionale Knockout Mäuse	26

1.7	Immortalisierte HoxB8 Zellen	27
1.8	Ziel und Fragestellung der Arbeit	29
2.	Material und Methoden	30
2.1	Material	30
2.2	Methoden	40
2.2.1	Tierexperimentelle Arbeiten	40
2.2.1.1	Isolierung muriner Knochenmarkzellen (KMZ)	40
2.2.2	Zellbiologische Methoden	40
2.2.2.1	Bestimmung der Zellzahl	40
2.2.2.2	Differenzieren der Knochenmarkzellen mit M-CSF	40
2.2.2.3	Differenzieren der Knochenmarkzellen mit GM-CSF	41
2.2.2.4	Ernten von M-CSF-stimulierten Knochenmarkmakrophagen	41
2.2.2.5	Ernten von GM-CSF-stimulierten Knochenmarkmakrophagen	42
2.2.2.6	Stimulierung von Zellen zur Messung der Zytokinmenge im Zellkulturüberstand	42
2.2.2.7	Vorinkubation der MΦ mit Inhibitoren	42
2.2.2.8	Stimulierung von Zellen zur Bestimmung der Zytokin-mRNA	43
2.2.3	Immunologische Methoden	43
2.2.3.1	Bestimmung der Zytokinmenge in Zellkulturüberstand mittels Sandwich-ELISA	43
2.2.3.2	Anfärbung des Aktinzytoskeletts durch Immunfluoreszenz	44
2.2.3.3	Nachweis von KMZ-spezifischen Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie	44
2.2.3.4	Immunoblotverfahren	45
2.2.3.4.1	Nachweis von Proteinen in Gesamtzelllysaten	45
2.2.3.4.2	Nachweis der Proteinphosphorylierung	47
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	47
2.2.4.1	Echtzeit-PCR-Quantifizierung (quantitative Real-Time PCR, ratiometrische Zytokintranskriptbestimmung)	47
2.2.5	Immortalisieren von Knochenmarkzellen	48

2.2.5.1 Isolierung von Knochenmarkszellen und Erythrozytenlyse	48
2.2.5.2 Trennung reifer Granulozyten von Knochenmarkszellen	48
2.2.5.3 Vermehrung der Zellen durch Inkubation in IL-3, IL-6 und SCF	49
2.2.5.4 Virusinfektion durch Spininfektion	49
2.2.5.4.1 Herstellen von Virusüberstand	50
2.2.5.5 Kryokonservieren von immortalisierten Zellen	50
2.2.5.6 Auftauen von Zellen	51
2.2.5.7 Differenzierung der immortalisierten Zellen	51
2.2.6 Statistik	51
3. Ergebnisse	52
3.1 Differenzierung von KMZ der LysM-eGFP Maus	52
3.1.1 Differenzierung von KMZ zu M-M Φ (LysM-eGFP)	52
3.1.2 Differenzierung von KMZ zu GM-M Φ (LysM-eGFP)	53
3.2 Nachweis der Depletion von GTPasen in M-MΦ und GM-MΦ aus konditionalen GTPase-Knockout Mäusen	55
3.3 Vergleich von Zellzahl und Morphologie differenzierter Makrophagen	56
3.4 Analyse der Oberflächenmarker auf Knochenmarkmakrophagen	60
3.4.1 Nachweis der M-M Φ -Oberflächenmarker	60
3.4.2 Nachweis der GM-M Φ -Oberflächenmarker	64
3.5 Einfluss der Depletion der GTPasen auf die TLR-Signalwege	69
3.5.1 Einfluss der GTPasen auf TLR-Signalwege in M-M Φ	69
3.5.2 Einfluss der GTPasen auf TLR-Signalwege in GM-M Φ	72
3.5.3 Pseudoprimäre immortalisierte KMZ (iKMZ)	74
3.5.3.1 Immortalisierte GM-M Φ (GM-iM Φ) mit depletierten GTPasen der Rho-Familie	75
3.5.3.2 Zytokinsekretion von GM-iM Φ nach TLR2- bzw. TLR4-Stimulierung	76
3.6 Quantitative Real-Time PCR zur Bestimmung von Zytokintranskripten	77
3.6.1 Ratiometrische Zytokintranskriptbestimmung in M-M Φ	77
3.6.2 Ratiometrische Zytokintranskriptbestimmung in GM-M Φ	79

3.7 Einfluss der Hemmung mit Rac1- und ROCK-Inhibitoren auf die PAMP-induzierte Zytokinfreisetzung	81
3.7.1 Hemmung von Rac1 und ROCK in M-M Φ	81
3.7.2 Hemmung von Rac1 und ROCK in GM-M Φ	82
3.8 Hemmung der PI3K	83
3.8.1 Hemmung der PI3K in M-M Φ	83
3.9 Analyse der Signaltransduktionskaskade	84
4. Diskussion	88
4.1 Rho GTPasen in TLR-Signalwegen und Methoden zu deren Untersuchung	88
4.2 Aktivität des LysM-Promotors in M-M Φ und GM-M Φ	90
4.3 Vergleich der PAMP/TLR-Antwort von M-M Φ mit der von GM-M Φ	92
4.4 M-M Φ (Rac1 ^{-/-}) sezernieren verstärkt IL-10, M-M Φ (RhoA ^{-/-}) sezernieren verstärkt IL-12	97
4.5 Untersuchungen zur PI3K-Abhängigkeit der Rho GTPasen in TLR-Signalwegen	100
4.6 Rho GTPase-depletierte M-M Φ als Modell für die Funktion von YopE und YopT auf die Zytokinfreisetzung	102
5. Literaturverzeichnis	105
Lebenslauf	117
Veröffentlichungen	118
Danksagung	119

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	ER	Endoplasmatisches Retikulum
ACT	Ammoniumchlorid-Tris	ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease	ErP	Erythrocyte Precursor
Akt	Protein Kinase B (auch PKB)	FACS	Durchflusszytometrie
AP-1	Activator Protein 1	FKS	Fötales Kälberserum
APS	Ammoniumpersulfat	Flt3L	Fms-like Tyrosine Kinase 3 Ligand
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated	GAP	GTPase Activating Proteins GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3-related Protein	G-CSF	Granulocyte Stimulating Factor
BMDC	Knochenmarkgenerierte DC	GDF5	Growth Differentiation Factor 5
BMDM	Knochenmarkgenerierte MΦ	GDI	Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors
BSA	Rinderserumalbumin	GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factors
CBP	CREB Binding Protein	GFP	enhanced Green Fluorescence Protein
CD	Cluster of Differentiation	GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
Cdc42	Cell Division Cycle 42	GM-iMΦ	immortalisierte GM-CSF differenzierte MΦ
CLP	Common Lymphoid Precursor	GM-MΦ	GM-CSF differenzierte murine Knochenmark-MΦ
CMP	Common Myeloid Precursor	GMP	Granulocyte Macrophage Precursor
CREB	cAMP Response Element-Binding Protein	GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Ct	Cycle Threshold	GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3β
DAMP	Danger Associated Molecular Pattern		
DC	Dendritische Zellen		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
dn	dominant negativ		
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
DUSP1	Dual Specificity Phosphatase 1		
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay		

Abkürzungsverzeichnis

HEK293	Zelllinie, Human Embryonic Kidney Cells	MEP	Megakaryocyte Erythrocyte Precursor
HeLa	Zelllinie, Henrietta Lacks	MHC	Major Histocompatibility Complex
HIV-LTR	Human Immunodeficiency Virus-Long Terminal Repeat	MkP	Megakaryocyte Precursor
HKSA	hitzeinaktivierte <i>Staphylo-</i> <i>coccus aureus</i>		M-MΦ M-CSF differenzierte murine Knochenmark-MΦ
HMEC	Human Dermal Microvessel Endothelial Cells	MPO	Myeloperoxidase
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl- Coenzym-A	MyD88	mTOR Mammalian Target of Rapamycin
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribo- syl-Transferase		Myeloid Differentiation Pri- mary Response Gene 88
HRP	Meerrettichperoxidase	MΦ	Monozyten / Makrophagen
IFN γ	Interferon gamma	MΦP	GM-CSF Makropagenvorläu- ferzellen
IKK	I κ B Kinase	n.d.	nicht detektierbar
IL	Interleukin	NF κ B	Nuclear Factor kappa-Light- Chain-Enhancer Of Activated B Cells
iMΦ	immortalisierte Makropha- gen		
IRAK	IL-1R-Associated Kinase	NK	Natural Killer
IRE	Interferone Responsible Ele- ments	NLR	Nucleotide Oligomerization Domain Like Receptor
IRF	Interferone Regulatory Fac- tor	NOX2	NADPH-Oxidase 2
JNK	c-Jun Terminal Kinase	PAMP	Pathogen Associated Molecu- lar Pattern
Ka	konstitutiv aktiv	PBS	Phosphatgepufferte Salz- lösung
KMZ	Knochenmarkzellen	PCR	Polymerasekettenreaktion
Ko	knockout	PDK-1	Phosphoinositide-dependent Kinase-1
LPS	Lipopolysaccharid	PFA	Paraformaldehyd
LRR	Leucinreiche Wiederholun- gen	PGE ₂	Prostaglandin E ₂
LysM	Lysozym M	PI3K	Phosphatidylinositol-3 Ki- nase
MAP	Mitogen Activated Protein	PIP2	Phosphatidylinositol-(4,5)- bisphosphat
MAPKKK	MAP Kinase Kinase Kinase		
M-CSF	Macrophage Colony Stimu- lating Factor		

Abkürzungsverzeichnis

PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat	SIGIRR	Single Immunoglobulin IL1R-related Molecule
PKA	Proteinkinase A	STAT3	Signal Transducer and Activator of Transkription 3
PMN	Granulozyten, neutrophile Granulozyten, Polymorphkernige Granulozyten	T3SS	Typ 3 Sekretionssystem
PRR	Pattern Recognition Receptors	TAB	TGF Activated Kinase / MAP3K7 Binding Protein
PTEN	Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosom 10	TACE	TNF- α -Converting Enzyme
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR	TAK1	TGF Activated Kinase
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	TEMED	Tetramethylethylendiamin
RANKL	Receptor Activator of NF κ B Ligand	TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
Ras	Rat sarcoma	TLR	Toll-Like Rezeptor
Rho	Ras Homologue Proteins	TMB	Tetramethylbenzidin
RhoA	Ras Homologue Gene Family Member A	TNF	Tumor Necrosis Factor
RhoBTB	BroadComplex/Tramtrack/Bric-a-brac Domain	TNFR	TNF Rezeptor
RIG-I	<i>Retinoic Acid-Inducible Gene-1</i>	Tpl2	Tumor Progression Locus 2
RIP1	Receptor Interacting Protein 1	TRADD	TNFR1 Associated DEATH Domain
RNA	Ribonukleinsäure	TRAF6	TNF Receptor-Associated Factor
Rnd	Rho-related GTP-binding Protein Family	TRAIL	TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
ROI	reaktive Sauerstoffintermediate	Tram	Trif-Related Adaptor Molecule
RP105	Radioprotectiv 105	TRIAD3A	Triad Domain Containing Protein 3 variant A
RT	Raumtemperatur	Trif	TIR Domain Containing Adaptor Inducing IFN β
SCF	Stammzellfaktor	wt	Wild Typ, in der vorliegenden Arbeit Bezeichnung für LysMCre Kontrollmäuse
SDS	Natriumdodecylsulfat	Yop	Yersinia Outer Protein
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-elektrophorese		

Zusammenfassung

Toll-Like Rezeptoren (TLR) erkennen Motive von diversen Komponenten (Proteine, Lipoproteine, Lipopolysaccharide, Nukleinsäuren) von Mikroorganismen, Viren und wirtseigenen Zellen, die als Agonisten eine Signalkaskade induzieren. Diese Agonisten werden als PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), MAMPs (*Microbe-Associated Molecular Patterns*) oder DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*) bezeichnet. Werden TLRs stimuliert, kommt es zur Aktivierung von Signalkaskaden, die in einer agonistenspezifischen Freisetzung charakteristischer Muster von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen münden. Infektionserreger haben unterschiedliche Strategien entwickelt, um mittels Pathogenitätsfaktoren die Erkennung durch Immunzellen und damit der Wirtsimmunantwort zu umgehen. Yersinien, Salmonellen und Shigellen injizieren über Typ 3 Sekretionssysteme (T3SS) Effektorproteine in Wirtszellen und modifizieren die Aktivität von Rho GTPasen. Bisher wurden diese T3SS-Effektoren hinsichtlich Phagozytoseaktivierung bzw. -inhibition untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, welche Rolle die Rho GTPasen von primären murinen Makrophagen für die TLR-Signalkaskade und Zytokinantwort haben könnten. Für diesen Zweck wurden erstmalig M-CSF differenzierte Knochenmarkmakrophagen (M-M Φ) sowie GM-CSF differenzierte Knochenmarkmakrophagen (GM-M Φ) mit gendelierten Rho GTPasen *Rac1*, *RhoA*, *Rac1/RhoA* sowie *Cdc42* auf ihre Zytokinantwort nach PAMP (LPS, Pam3CSK4 und CpG) -Stimulierung untersucht. Für die konditionale Gendelektion wurden Mäuse mit „geflochten“ Rho GTPase-Genen mit LysMCre Mäusen zur zellspezifischen Gendelektion gekreuzt. Die Aktivität des LysM-Promotors wurde in M-M Φ und GM-M Φ aus LysM-eGFP *knockin* Mäusen überprüft. Dabei wurde nachgewiesen, dass eine LysMCre abhängige Gendelektion mit nachfolgender Depletion von Rho GTPasen sowohl in M-M Φ als auch in GM-M Φ mit sehr hoher Effizienz entsteht. Interessanterweise zeigten GM-M Φ , die in der Literatur auch als DCs bezeichnet und damit keinen aktiven LysM Promotor haben sollten (Clarke and Gordon, 1998), ein starkes LysM-eGFP Signal und wiesen auch Rho GTPase-Gendelektionen auf. Bei den GM-M Φ handelt es sich wahrscheinlich um eine Mischpopulation unterschiedlich differenzierter M Φ -Subpopulationen, die keine klare PAMP/TLR-Signalantwort erwarten lassen. Neben der Verwendung von primären Knochenmarkzellen sollte geprüft werden, ob HoxB8 immortalisierte Knochenmarkzellen (Wang *et al.*, 2006) von konditionalen Rho GTPase-*knockout* Mäusen ebenso für die TLR Fragestellung verwendet werden können. Das Wachstumsverhalten sowie die Oberflächenmarker der immortalisierten GM-iM Φ ähneln dem der primären GM-M Φ (Rosas *et al.*, 2011), jedoch nicht das Zytokinsekretionsmuster nach TLR-Stimulierung. Da auch die immortalisierten GM-iM Φ heterogene Populationen bilden, wurde auf eine weitere Analyse hinsichtlich der PAMP-Zytokinantwort verzichtet und

die Analyse auf primäre M-M Φ fokussiert. In M-M Φ (Rac1^{-/-}) und M-M Φ (RhoA^{-/-}) konnten eindeutige Unterschiede zu M-M Φ (wt) und damit eine wichtige Rolle der Rho GTPasen bei der TLR-Signalkaskade und Zytokinantwort in M-M Φ nachgewiesen werden. Die 6 h-Stimulierung mit den spezifischen TLR2-, TLR4- bzw. TLR9-Agonisten Pam3CSK4, LPS bzw. CpG führte in M-M Φ (Rac1^{-/-}) zu verstärkter IL-10 Sekretion (exkl. TLR2), in M-M Φ (RhoA^{-/-}) dagegen zu verstärkter IL-12 Sekretion. Nach 24 h-Stimulierung mit den verschiedenen TLR-Agonisten sind die Zytokinmuster für die M-M Φ (wt) und Rho GTPase-deletierten M-M Φ ähnlich (exkl. für IL-10 nach TLR2- und TLR9-Stimulierung).

Yersinien injizieren mittels T3SS-Injektisome den Rac1-Inhibitor YopE (Rac-GAP) und den Rho GTPasen-Inhibitor YopT (proteolytische Spaltung des C-terminalen prenylierten Cystein-Membranankers, bevorzugt von RhoA), was zur Inhibition der Rho GTPasen der kontaktierten Phagozyten führt. Es wurden deshalb auch die Zytokinmuster nach TLR-Stimulierung von M-M Φ (Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-}) bestimmt. Im Vergleich zu M-M Φ (wt) war die IL-12 Antwort praktisch unverändert, während die TNF- α und die IL-6 Antwort der M-M Φ (Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-}) erhöht waren. Mit diesen Ergebnissen der Rac1- und RhoA-abhängigen Freisetzung von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen durch M-M Φ können jetzt gezielte infektionsbiologische Untersuchungen z. B. mit Yersinien durchgeführt werden, um die pathogenetische Bedeutung der mikrobiellen Modulation der Rho GTPasen auf die Wirtsabwehr bzw. Zytokinantwort zu analysieren.

Abstract

Toll-like Receptors (TLRs) recognize diverse patterns (proteins, lipoproteins, lipopolysaccharides, nucleic acids) of microorganisms, viruses and host cells, which are able to induce intracellular signaling cascades. These TLR agonists are known as PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), MAMPs (microbe-associated molecular patterns) or DAMPs (damage-associated molecular patterns). The stimulation of TLRs induces a signaling cascade that leads to specific, agonist-dependent secretion of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Pathogens have developed different strategies, e.g. expression of virulence factors in order to avoid the recognition by immune cells and to bypass the host immune response. Gram-negative enterobacteria like *Yersinia*, *Salmonella* and *Shigella* inject effector proteins via their type 3 secretion systems (T3SS) into the host cell. These effector proteins are able to modulate the activity of Rho GTPases. Until now, T3SS effectors were analyzed regarding activation or inhibition of phagocytosis.

In this study, we investigated the role of Rho GTPases on the TLR signaling cascade and cytokine response in primary murine macrophages. For this purpose, we used M-CSF differentiated bone marrow derived macrophages (M-M Φ) and GM-CSF differentiated bone marrow macrophages (GM-M Φ) with gene deletions of Rho GTPases *Rac1*, *RhoA*, *Rac1/RhoA* or *Cdc42* and analyzed cytokine secretion after PAMP (Pam3CSK4, LPS and CpG) stimulation. For conditional cell specific gene deletions, mice with floxed genes for Rho GTPase were crossed with LysMCre mice. The activity of the LysM promoter was examined in M-M Φ and GM-M Φ of LysM-eGFP knockin mice. We show that in M-M Φ and GM-M Φ , a LysMCre-dependent gene deletion of Rho GTPases can be induced with high efficiency. Interestingly, GM-M Φ , also known as bone marrow derived dendritic cells (BMDC) that should not have LysM promoter activity, show a strong LysM-eGFP signal and depletion of Rho GTPases. Since GM-M Φ are most probably a mixed population of unequally differentiated subpopulations of macrophages, a clear PAMP/TLR-signaling response cannot be expected. In addition to primary bone marrow cells, we used HoxB8 immortalized cells (Wang *et al.*, 2006) of conditional knockout mice to investigate the cytokine secretion pattern after PAMP stimulation. Growth behavior and expression of surface markers is similar on primary and immortalized macrophages (Rosas *et al.*, 2011) but the cytokine secretion pattern after TLR stimulation is different in Rho GTPase-depleted cells. Since immortalized GM-iM Φ form a heterogeneous population just as the primary GM-M Φ , we focused on M-M Φ for further cytokine response analysis. In M-M Φ (*Rac1*^{-/-}) and M-M Φ (*RhoA*^{-/-}) compared to M-M Φ (wt) we demonstrate clear differences and therefore an important role in TLR signaling and cytokine response. Stimulation for 6 h of TLR2, TLR4 and TLR9 with their specific agonists Pam3CSK4, LPS or CpG led to enhanced secretion of IL-10 in M-M Φ (*Rac1*^{-/-}) (excl. TLR2) and to enhanced secretion of IL-12 in M-M Φ (*RhoA*^{-/-}). Cytokine secretion patterns after stimulation for 24 h with the specific TLR-agonists was similar for

M-MΦ(wt) and Rho GTPase depleted M-MΦ, except for IL-10 after TLR2 and TLR9 stimulation. *Yersinia enterocolitica* injects the Rac1 inhibitor YopE (Rac1-GAP) and the Rho GTPase inhibitor YopT (proteolytic cleavage of C-terminal prenylated cysteine membrane anchor, preferably RhoA) via its T3SS, which leads to inhibition of Rho GTPases in phagocytes after bacterial contact. Therefore, we determined the cytokine pattern after TLR stimulation in M-MΦ(Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-}). Compared to M-MΦ(wt) the IL-12 response in M-MΦ(Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-}) was nearly unchanged, but the TNFα and IL-6 response was enhanced. With these results of Rac1 and RhoA dependent release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines by M-MΦ, infectious biological investigation e.g. with *Yersinia* can be performed in order to analyze the pathogenetic significance of microbial induced Rho GTPase modulation on host defense or cytokine response.

1. Einleitung

1.1 Immunität

Nach Charles Darwin ist mit der Entwicklung der Lebewesen auch ein Konkurrenzverhalten um Lebensräume entstanden, die durch diverse Abwehrstrategien verteidigt werden. Die am weitest entwickelten Abwehrmechanismen haben warmblütige Tiere gegen Infektionserreger entwickelt. Es besteht aus zwei Einheiten, dem angeborenen und dem erworbenen (adaptives) Immunsystem. Beide Einheiten haben zelluläre und humorale Komponenten, durch die sie distinkte Funktionen ausüben können, wobei beide Systeme sich auch gegenseitig beeinflussen können bzw. miteinander kommunizieren.

Die Infektionsabwehr lässt sich in zwei Phasen unterteilen: Die Erregererkennung und die Erregereliminierung. Dabei fungiert das angeborene Immunsystem als erste Barriere der Abwehr (unspezifische Sofortreaktion). Das adaptive Immunsystem hingegen braucht einige Tage, um antigen-spezifisch auf den Erreger, der die Infektion hervorgerufen hat, zu reagieren (Antikörper und zelluläre Abwehr) und ist auch in der Lage, bei einer zweiten Infektion mit demselben Erreger schneller und verstärkter zu reagieren (Biswas and Mantonani, 2010).

1.1.1 Angeborene Immunität

Zu den humoralen Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören das Komplementsystem, Akutphaseproteine, Chemokine und Zytokine (Medzhitov, 2007). Monozyten / Makrophagen (MΦ), Dendritische Zellen (DC) und Granulozyten (PMNs) bilden die zellulären Komponenten der angeborenen Immunität. Diese Zellen erkennen ein breites Spektrum von molekularen Mustern, sogenannten PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Pattern*), die bei Mikroorganismen vorkommen. Allerdings werden auch PAMP-ähnliche Wirtszellbestandteile z.B. nach Zellnekrose freigesetzt, die als DAMPs (*Danger Associated Molecular Pattern*) bezeichnet werden. PAMPs und DAMPs werden von Mustererkennungsrezeptoren, PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) (Janeway, Jr., 1989), die sowohl auf der Oberfläche als auch intrazellulär von Wirtszellen exprimiert werden, aber auch in die Umgebung oder ins Blut sekretiert werden (Janeway, Jr., 2002), detektiert. Die Zellen der angeborenen Immunität gehören zum hämatopoetischen System, zirkulieren in Blut- und Lymphgefäßen und können das Gewebe infiltrieren. Dort können sie Erreger phagozytieren und durch Ausschüttung bestimmter Zytokine weitere Immunzellen anlocken und die adaptive Immunantwort durch die Interaktion mit T- und B- Zellen im lymphatischen Gewebe induzieren (Kumar *et al.*, 2009). Alle Zellen des Immunsystems haben ihren Ursprung im Knochenmark. Während der Hämatopoese entwickeln sie sich durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren

wie SCF (*Stem Cell Factor*), G-CSF (*Granulocyte Stimulating Factor*), GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) oder M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*) aus pluri-potenten Stammzellen. Dabei unterscheidet man die lymphoide Linie (adaptives System), in der sich B-, T-, und NK (*Natural Killer*)- Zellen entwickeln, und die myeloide Linie (angeborenes System), in der sich Granulozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen, aber auch Thrombozyten und Erythrozyten bilden (Janeway *et al.*, 2008, Rieger and Schroeder, 2007) (Abb. 1.1).

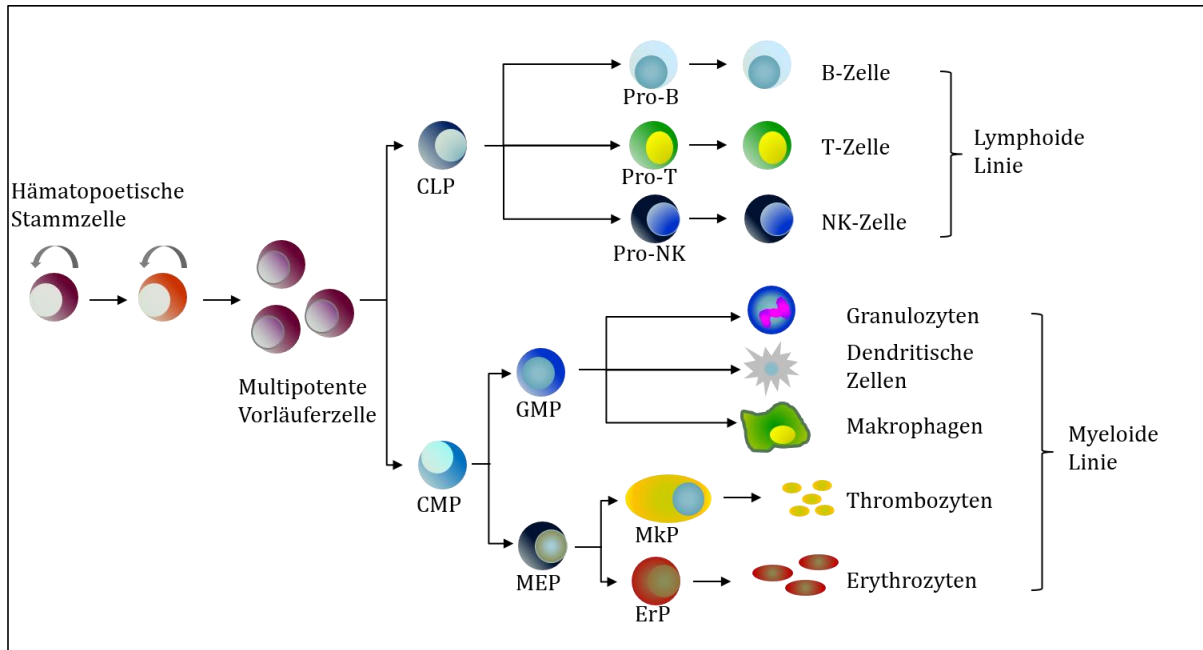


Abb. 1.1: Entwicklung von Immunzellen während der Hämatopoese aus Stammzellen. Zellen der lymphoiden Linie entwickeln sich aus CLP (*Common Lymphoid Precursor*), die der myeloiden Linie aus CMP (*Common Myeloid Precursor*). GMP (*Granulocyte Macrophage Precursor*), MEP (*Megakaryocyte Erythrocyte Precursor*), MkpP (*Megakaryocyte Precursor*), ErP (*Erythrocyte Precursor*) (nach Rieger and Schroeder, 2007).

1.2 Zellen der angeborenen Immunität

1.2.1 Monozyten / Makrophagen

Monozyten können aus dem Knochenmark in das Gefäßsystem einwandern (Blutmonozyten) und in lymphatische Organe sowie Gewebe auswandern (Makrophagen). Da inzwischen verschiedene Differenzierungsstudien von Monozyten / Makrophagen bekannt sind, soll hier die allgemeine Abkürzung MΦ im übergeordneten Sinn gebraucht werden. Makrophagen sind so im Organismus verteilt, dass sie körperfremde Stoffe und apoptotische Zellen aufnehmen und eliminieren (Murray and Wynn, 2011) und als Alveolarmakrophagen, Kupfferzellen oder Langerhanszellen durch die Produktion von Wachstumsfaktoren die Homöostase von Organen regulieren können (Geissmann *et al.*, 2010). Als Antwort auf eine Entzündung sind sie durch Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen in der Lage, weitere Zellen zum Entzündungsherd zu locken. Die Vorläufer der Makrophagen sind Monozyten, die in der Blutbahn zirkulieren. Migrieren Monozyten durch das Endothelium, differenzieren sie zu Makrophagen oder entsprechend der vorhandenen Chemokine / Zytokine zu Dendritischen Zellen (Murray and Wynn, 2011). Es gibt Hinweise, dass Makrophagen ein breites Spektrum unterschiedlicher Phänotypen entwickeln können und damit funktionell keine einheitliche Population bilden (Mosser and Edwards, 2008). Klassisch aktivierte Makrophagen (M1 Makrophagen) vermitteln die Immunabwehr durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Erregerphagozytose. Alternativ aktivierte Makrophagen (M2 Makrophagen) haben antiinflammatorische Wirkung, sind beteiligt an der Wundheilung und haben regulatorische Funktionen (Abb. 1.2). Des Weiteren sind tumorassoziierte Makrophagen in der Lage, die Antitumoraktivität des Organismus zu unterdrücken (ähnlich wie M2 Makrophagen) (Murray and Wynn, 2011).

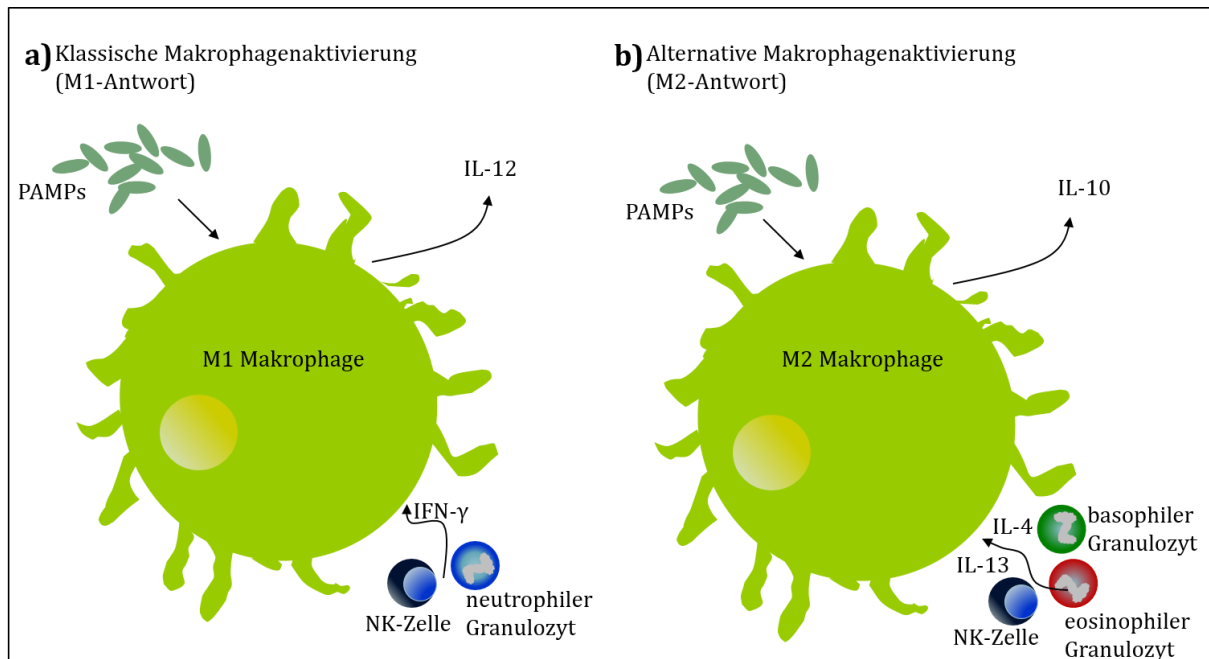


Abb. 1.2: Modell der klassischen und alternativen Aktivierung von Makrophagen. Für die Aktivierung von Makrophagen werden zwei Signale benötigt. 1) die Erkennung von PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) und 2) die Stimulierung mit IFN γ oder IL-4 und IL-13. a) Durch die Aktivierung durch PAMPs werden Chemokine ausgeschüttet, die IFN γ produzierende Zellen anlocken, wodurch es zur klassischen Aktivierung von Makrophagen kommt. Dies führt zur IL-12 Sekretion. b) Durch Aktivierung von noch unbestimmten Oberflächenrezeptoren kommt es zum Anlocken von Immunzellen, die IL-4 und IL-13 sekretieren, wodurch es zur alternativen Aktivierung von Makrophagen kommt. Diese produzieren IL-10. (nach Martinez *et al.*, 2009).

1.2.2 Dendritische Zellen vs. Makrophagen und Granulozyten

Wie Makrophagen sind auch Dendritische Zellen (DCs) und Granulozyten (PMNs) professionelle phagozytierende Zellen (Murray und Wynn, 2011). Man unterscheidet klassische und plasmazytoide Dendritische Zellen. Klassische DCs haben als unreife Zellen eine hohe Phagozytoseaktivität, geringe Migrationsfähigkeit und sekretieren Zytokine. Nach Aktivierung mit z.B. PAMPs wandern sie zur Antigenpräsentation in T-Zellareale von Lymphknoten und Milz und bestimmen durch ihre Zytokinsekretion die T-Zellantwort. Es sind kurzlebige, migratorische und T-Zell-regulierende Zellen. Plasmazytoide Dendritische Zellen (pDCs) sind langlebiger als klassische (kDCs). Sie sind wahrscheinlich spezialisiert auf virale Infektionen und produzieren bei einer Infektion massiv Typ I Interferon. Es sind ebenfalls antigenpräsentierende Zellen, die die T-Zell-Antwort kontrollieren (Geissmann *et al.*, 2010). Eine Unterscheidung von Makrophagen und Dendritischen Zellen beruht auf der Expression von Oberflächenmarkern, wobei CD11c ein DC-Marker und F4/80 ein M Φ -Marker ist. Dabei kann CD11c aber auch auf M Φ und F4/80 ebenfalls auf eosinophilen und neutrophilen Granulozyten exprimiert sein (Hashimoto *et al.*, 2011). Eine Unterscheidung *in vivo* ist anhand folgender Faktoren laut Hashimoto *et al.* möglich: I) DCs entwickeln sich durch Stimulierung mit Flt3L, M Φ durch Einfluss von M-CSF. II) DCs fehlen die Oberflächenmarker CX3CR1,

M-CSF-Rezeptor, CD11b, F4/80 oder CD172a, wobei aber mindestens einer davon auf M Φ exprimiert ist. III) DCs sind stärker zur T-Zell-Aktivierung in der Lage als M Φ und IV) DCs haben ein stärkeres Potential, in Lymphknoten zu migrieren, als Makrophagen.

Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten (PMNs) enthalten zahlreiche charakteristische Granula und haben einen segmentierten Kern. Von den Blutgefäßen aus transmigrieren sie entsprechend des Chemokingradienten, der vom Ort der Entzündung ausgeht, in das Subendothelium (ves-Filho *et al.*, 2008). Ihre Granula werden in primäre oder azurophile, sekundäre oder spezifische und tertiäre klassifiziert (Borregaard, 2010; Hashimoto *et al.*, 2011). Dabei treten azurophilen Granula im Laufe der Entwicklung von PMNs als erstes auf und werden daher als primäre Granula bezeichnet. Sie kommen ebenfalls in M Φ vor und enthalten u.a. α -Defensine und Myeloperoxidasen (MPO). Sie werden ausgeschüttet, nachdem Enzyme aus den spezifischen Granula freigesetzt wurden. Die sekundären oder spezifischen Granula kommen nur in PMNs vor und weisen u.a. Lysozym, Kollagenasen und Laktoferrin auf. Tertiäre Granula werden aufgrund der enthaltenen Gelatinasen auch als Gelatinase Granula bezeichnet. Eine der Hauptfunktionen von PMNs ist der oxidative Burst, der einen antimikrobiellen Mechanismus darstellt (Nathan, 2006). Hierbei wird nicht-mitochondrial Sauerstoff reduziert, wobei reaktive radikale Sauerstoffintermediate (ROIs) entstehen. Produkte des oxidativen Bursts sind Superoxid, Ozon oder Wasserstoffperoxid. ROIs entstehen in PMNs und Makrophagen durch die NADPH-Oxidase 2 (NOX2), die aus mehreren Untereinheiten (p67phox, p40phox, p47phox und Rac2 (zytosolische Untereinheit) und p22phox und gp91phox (membrangebundene Untereinheit) besteht. Durch die Phagozytose von Mikroorganismen wird NOX2 in der Phagosomenmembran aktiviert (Winterbourn, 2008). Daraufhin werden Elektronen von NADPH über die Membran transportiert, um Sauerstoffradikale zu erzeugen, die weiter zu Wasserstoffperoxid reagieren können. Die Myeloperoxidase katalysiert anschließend die Reaktion von Wasserstoffperoxid und Chlorid (Cl⁻) zu Wasser und Hypochlorid (OCl⁻), das hochreaktiv Amine in antimikrobielle Chloramine umwandelt.

1.3 Rezeptoren der angeborenen Immunität

Die Zellen des Immunsystems erkennen PAMPs durch die Expression unterschiedlichster PRR. Zu den PRRs gehören membrangebundene (zytoplasmatische und endosomale Membran) TLRs (*Toll-Like Receptors*) und zytoplasmatische PRRs wie die (RIG)-I-Familie (*Retinoic Acid-Inducible Gene-1*) und die NLR-Familie (*Nucleotid Oligomerization Domain Like Receptor*). PAMPs können über die entsprechenden PRRs eine Signaltransduktionskaskade aktivieren, die zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Interferon (Janeway, Jr. and Medzhitov, 2002, Akira *et al.*, 2006, Medzhitov, 2007, Beutler *et al.*, 2009) sowie zur Aktivierung co-stimulatorischer Rezeptoren führt. Darüber hinaus kann der proinflammatorischen PAMP/TLR-Antwort eine antiinflammatorische folgen.

1.3.1 Toll-Like Rezeptoren

Toll-Like Rezeptoren sind evolutionär konservierte Transmembranrezeptoren. Der Name leitet sich vom *Toll*-Gen ab, das in der Embryogenese von *Drosophila melanogaster* eine Rolle spielt (Anderson *et al.*, 1985). Im Embryo der Fruchtfliege ist dieser Rezeptor verantwortlich für die Ausbildung der dorso-ventralen Achse. Im adulten Tier führt die Aktivierung zu einer intrazellulären Signalkaskade und damit zur Ausschüttung antimikrobieller Proteine.

TLRs sind Typ-I transmembrane Glycoproteine, die aus einer trimodularen Struktur aufgebaut sind. Die extrazelluläre N-terminale Domäne enthält etwa 16-28 leucinreiche Wiederholungen (LRR), wobei jede Wiederholung aus 20-30 Aminosäuren mit dem konservierten Motiv LxxLxLxxN besteht (Kumar *et al.*, 2009). Die transmembrane Domäne verankert den Rezeptor in der Membran und die intrazelluläre C-terminale Domäne wird aufgrund ihrer Homologie zur intrazellulären Domäne des IL-1 Rezeptors als Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne bezeichnet. Sie ist wichtig für die nachfolgende Aktivierung von Signalwegen durch die Interaktion mit verschiedenen Adaptermolekülen und Kinasen (Kawai and Akira, 2010).

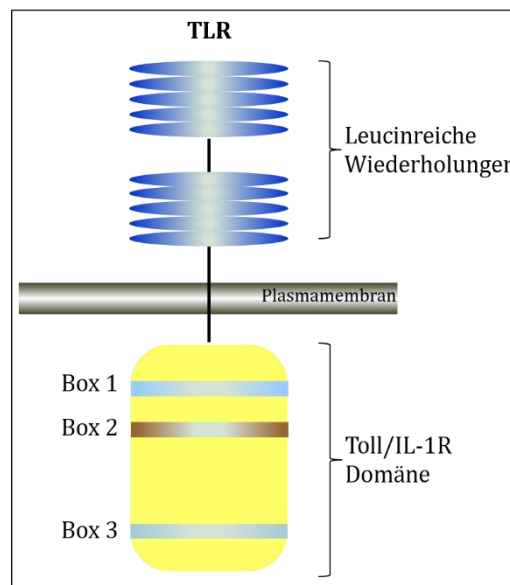


Abb. 1.3: Schematischer Aufbau von TLRs. Die extrazelluläre Domäne der TLRs besteht aus leucinreichen Wiederholungen, die für die PAMP-Erkennung wichtig sind. Die intrazelluläre Domäne wird aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur intrazellulären IL-1R-Domäne als TIR (Toll/IL-1R) Domäne bezeichnet und ist charakterisiert durch drei homologe Regionen (Box 1, 2, 3), in denen die Interaktion mit Adaptermolekülen stattfindet. (nach Akira *et al.*, 2004).

Beim Menschen sind 10 und in der Maus 12 TLRs bekannt, wobei TLR1-TLR9 in beiden Spezies konserviert sind (Kawai and Akira, 2010). TLR10 ist in der Maus aufgrund einer retroviralen Veränderung des Genoms nicht funktionsfähig und TLR11, TLR12 und TLR13 sind im humanen Genom im Laufe der Evolution verloren gegangen (Kawai and Akira, 2010). Jeder TLR erkennt spezifische PAMPs von Viren, Bakterien, Pilzen oder Parasiten (Akira *et al.*, 2006). Sie können auf der

Zelloberfläche (Zytoplasmamembran) exponiert sein, aber auch in intrazellulären Vesikeln (Endoplasmamembran), wie Endoplasmatisches Retikulum, Endosom, Lysosom und Endolysosom (Blasius and Beutler, 2010). Auf der Zelloberfläche exponierte TLRs sind TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11. Sie erkennen hauptsächlich mikrobielle Membranbestandteile. Die TLRs 3, 7, 8 und 9 sind intrazellulär in Vesikelmembranen lokalisiert und erkennen bestimmte DNA- und RNA-Sequenzmuster. TLRs sind auf unterschiedlichsten Immunzellen sowie auf nicht Immunzellen wie Fibroblasten, Epithelzellen oder Keratinozyten exprimiert (Kawai and Akira, 2007). Eine Zusammenfassung über die Lokalisation der TLRs, ihre Liganden und die Adapterproteine ist in Tabelle 1.1 aufgelistet.

Tab. 1.1: Arten von Toll-like Rezeptoren. Aufgelistet sind ihre Lokalisation, ihre Liganden, sowie die am Signalweg beteiligten Adapterproteine (nach Akira *et al.*, 2006 und Blasius and Beutler, 2010).

TLRs	Lokalisation	Ligand	Adapterproteine
TLR1 / TLR2 Co-Faktor CD14	Zelloberfläche	Triacetylierte Lipoproteine, Gram-positive Bakterien	Tirap, MyD88
TLR2 / TLR6 Co-Faktor CD14	Zelloberfläche	Diacetylierte Lipoproteine, Gram-positive Bakterien	Tirap, MyD88
TLR3	Endosom	Doppelstrang-RNA (dsRNA), Polyinosin:Polycytidylsäure (PolyI:C)	Trif
TLR4 Co-Faktor CD14, MD2	Zelloberfläche	Lipopolysaccharid (LPS), Gram-negative Bakterien	Tram, Trif, Tirap, MyD88
TLR5	Zelloberfläche	Flagellin	MyD88
TLR7	Endosom	Einzelstrang-RNA (ssRNA)	MyD88
TLR8	Endosom	Einzelstrang-RNA (ssRNA)	MyD88
TLR9	Endosom	Cytosin-Phosphatidyl- Guanin DNA (CpG DNA)	MyD88
TLR11	Zelloberfläche	Uropathogene Bakterien	MyD88
TLR13	Endosom	Vesikular Stomatitis Virus (VSV)	MyD88

1.3.2 Toll-Like Rezeptorsignalwege

TLRs sind homo- oder heterodimere membranständige Rezeptoren. Nach der Bindung spezifischer PAMPs an den jeweiligen Rezeptor werden Signalwege angeschaltet, die zur Freisetzung inflammatorischer Zytokine, zur Hochregulation co-stimulatorischer Moleküle und zur Induktion von Typ I Interferon (IFN) führen können (Kawai and Akira, 2007). Hierzu werden Adaptermoleküle zum Rezeptor rekrutiert, die eine TIR-Domäne enthalten wie MyD88 (*Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88*), Tirap (auch Mal (*MyD88 Adapter-Like*)) *Toll-Interleukin 1 Receptor Domain Containing Adaptor Protein*), das durch eine N-terminale PIP₂ Bindedomäne an der Plasmamembran lokalisiert ist und MyD88 an die Membran rekrutiert (Kagan and Medzhitov, 2006), Trif (*TIR Domain Containing Adaptor Inducing IFN β*) und Tram (*Trif-Related Adaptor Molecule*). Alle TLRs bis auf TLR3 nutzen als Adaptermolekül MyD88. TLR-Signalkaskaden führen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (*Nuclear Factor kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells*) und der MAP Kinasen (*Mitogen Activated Protein Kinase*) (ERK, JNK und p38). TLR3 und TLR4 können Trif rekrutieren, was zur Aktivierung von NF κ B, MAP Kinasen, aber auch von IRF3 (*Interferone Regulatory Factor*) führt. Durch die Aktivierung von IRF3 kommt es zur Induzierung von Typ I IFN.

Durch die Interaktion der TLRs mit MyD88 kommt es zur Rekrutierung von Molekülen der IRAK (*IL-1R-Associated Kinase*) Familie. Nach ihrer Phosphorylierung dissoziieren sie von MyD88, um mit TRAF6 (*TNF Receptor-Associated Factor*) zu interagieren. TRAF6 interagiert dann mit TAK1 (*TGF Activated Kinase*) und TAB1/TAB2 (*TGF Activated Kinase / MAP3K7 Binding Protein*). Dieser Komplex wandert ins Zytoplasma, wo es zur Lysin63-Polyubiquitylierung und damit zur Aktivierung von TAK1 kommt. TAK1 ist eine MAPKKK (MAP Kinase Kinase Kinase) und aktiviert nachfolgend den IKK (I κ B Kinase)-Komplex, wodurch es zur Phosphorylierung von I κ B kommt und damit zur Freisetzung von NF κ B, der als Transkriptionsfaktor in den Kern wandert und die Expression von inflammatorischen Genen hochreguliert. Neben der Aktivierung von IKK ist der TAK-TAB Komplex ebenfalls wichtig für die Aktivierung von MAP Kinasen, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führen. Des Weiteren kommt es zur Aktivierung der PI3K (Phosphatidylinositol-3 Kinase), die wahrscheinlich MyD88 und Traf6 nachgeschaltet ist. Im Folgenden wird Akt (auch PKB (Protein Kinase B)) phosphoryliert, was für die Aktivierung von NF κ B und die Translokation in den Kern wichtig zu sein scheint (Dauphinee and Karsan, 2006), dabei soll Akt p38 abhängig IKK β aktivieren, wodurch es zur Phosphorylierung der Transaktivierungsdomäne von NF κ B sowie nachfolgend zu einer verstärkten Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA kommen soll (Madrid *et al.*, 2001).

Neben dem MyD88-abhängigen Signalweg gibt es den Trif-abhängigen Signalweg. Dieser wird durch TLR3 und TLR4 aktiviert und führt ebenfalls zur Induktion inflammatorischer Zytokine. Dazu bindet Trif direkt an Traf6. Traf6 bindet dann auf wahrscheinlich ähnliche Art und Weise,

wie im MyD88-abhängigen Signalweg beschrieben, an TAK1, wodurch es zur NFκB Aktivierung und über die MAPK zur Aktivierung von AP-1 kommt. Trif kann ebenfalls an Rip1 binden und einen Multiproteinkomplex mit Tradd, Traf6 und Pellino-1 bilden, wodurch es Lysin63-ubiquitinyliert von Rip1 kommt. Daraufhin kommt es zur Aktivierung von TAK1 und zur Aktivierung von NFκB und MAPK (Kawai and Akira, 2007). Neben der Aktivierung von NFκB und AP-1 führt der Trif-abhängige Signalweg auch zur Aktivierung von IRF3 und damit zur Transkription von Typ I Interferon. Hierzu wird ein Komplex aus Traf3, IKKε und TBK1 zum Adapterprotein Trif rekrutiert, wodurch es zur Phosphorylierung von IRF3 und seiner Translokation in den Kern kommt. TLR4 ist damit der einzige TLR, der sowohl den MyD88 abhängigen als auch den Trif abhängigen Signalweg nutzt und damit zwei unterschiedliche Signalwege aktiviert (Kawai and Akira, 2010), was wichtig ist, um eine stabile NFκB und MAP Kinasen Aktivierung zu erzeugen und damit nachfolgend die Induktion inflammatorischer Zytokine zu ermöglichen (Kawai and Akira, 2011). Für die TLR4-Signalwege ist weiter beschrieben, dass für die optimale Expression von IL-12 (Perera *et al.*, 2001) und TNFα (Triantafilou *et al.*, 2001a, b) ein Komplex aus TLR4/CD14/MD2 und CD11b/CD18, Hitzeschockproteinen 70 und 90, Chemokinrezeptor 4 und GDF5 (*Growth Differentiation Factor 5*) vorliegen muss. Dieser Komplex bildet sich in *Lipid rafts* durch die LPS-vermittelte Rekrutierung von TLR4, MD2 und CD11b/CD18 (Triantafilou *et al.*, 2001a, b).

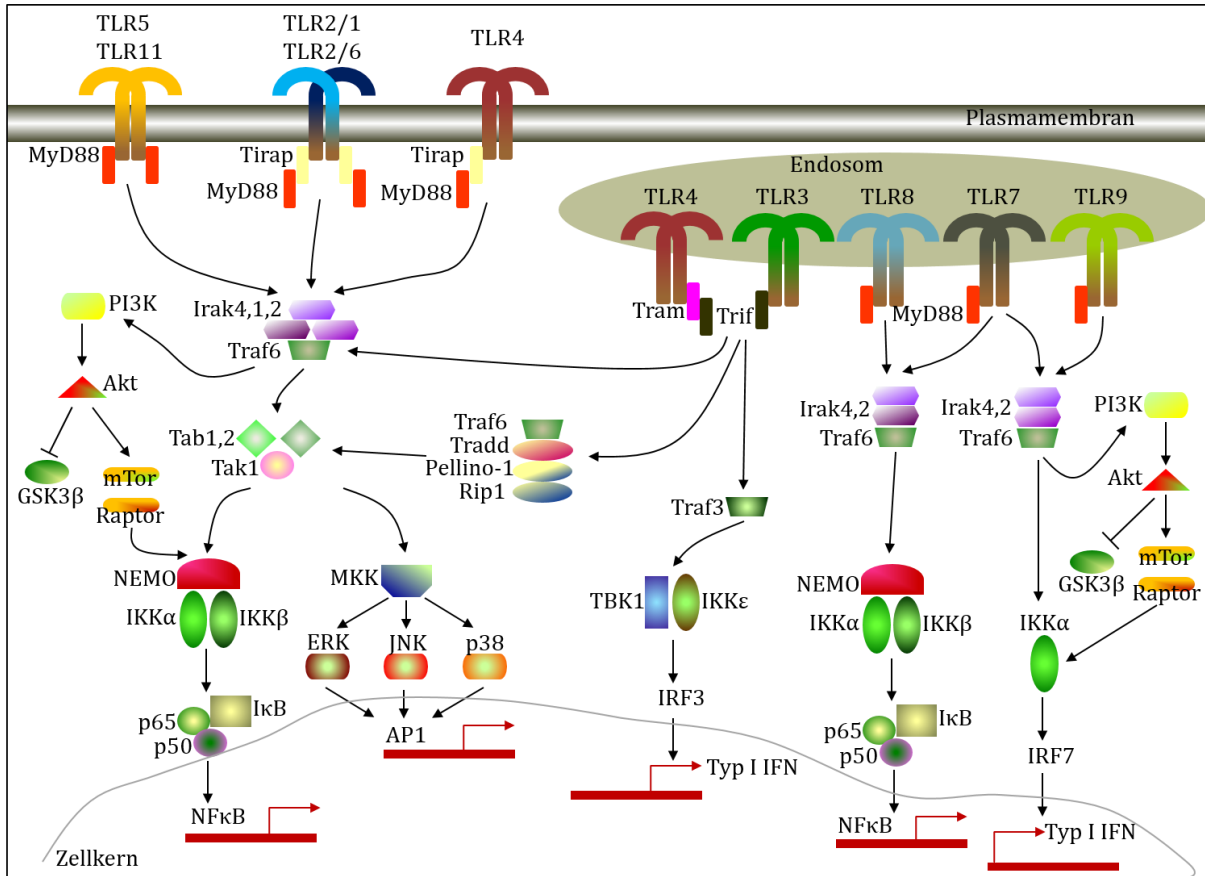


Abb. 1.4: TLR und ihre nachfolgenden Signalwege. Dargestellt sind die verschiedenen TLR, ihre Lokalisation, sowie die Adaptorproteine und nachfolgende Signalkaskade. IRF (*Interferone Regulatory Factor*), IRE (*Interferone Responsible Elements*), NEMO (IKK γ). (nach Kumar *et al.*, 2009 und Kawai and Akira, 2010).

Da die TLR-Signalwege starke Immunreaktionen hervorrufen, ist es notwendig, mögliche inflammationsbedingte Gewebeschäden zu vermeiden. Dies geschieht z.B. durch inhibitorische Signalwege (Lu *et al.*, 2008). Auf der Zelloberfläche sind die Moleküle RP105 (*Radioprotectiv 105*) (Divanovic *et al.*, 2005), IL-1R1 (Brint *et al.*, 2004) und SIGIRR (*Single Immunoglobulin IL1R-related Molecule*) (Qin *et al.*, 2005) exprimiert, die beispielsweise die TLR4-Aktivierung hemmen. Dies kann entweder durch kompetitive Hemmung, durch Verhinderung der TLR4-Rekrutierung zur Membran oder durch Inhibierung der Bindung an MyD88 erfolgen (kompetitiv). Des Weiteren kann TRIAD3A (*Triad Domain Containing Protein 3 variant A*), eine Ubiquitin-E3-Ligase die Degradation von TLR4 und weiteren Signalmolekülen begünstigen. SOCS-1 ist ein Zytokinregulator, der den Jak/STAT-Signalweg hemmt, und in der Lage, die Ubiquitylierung von TIRAP zu induzieren, was zur Herunterregulierung des LPS-induzierten Signals führt (Mansell *et al.*, 2006). Intrazelluläre negative Regulatoren wie IRAK-M (Wesche *et al.*, 1999), IRAK-2c (Hardy *et al.*, 2004) und MyD88s (Burns *et al.*, 2003) sind wahrscheinlich Splicevarianten, die die Signalweiterleitung durch Domänenverlust hemmen.

1.3.3 Überlagerungen von TLR-Signalwegen und G-Protein-vermittelten Signalwegen

Für eine effektive Immunantwort sind Überlagerungen (*Crosstalk*) zwischen TLR-vermittelten Signalkaskaden und Signalwegen, die durch andere Rezeptoren vermittelt werden, unerlässlich. Dabei kann es sich um synergistische und antagonistische Effekte handeln (Hildebrand *et al.*, 2012). TLR-Signalwege werden von G-Protein-vermittelten Signalwegen überlagert, die ebenfalls in der Lage sind, Zytokinsekretion zu regulieren. Heterotrimeren G-Proteine bestehen aus einer α -Untereinheit (G_α) und einer dimerisierten $\beta\gamma$ -Untereinheit ($G_{\beta\gamma}$). Durch die Bindung eines Liganden an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) geschieht der Austausch von GDP zu GTP an der G_α -Untereinheit, wodurch es zur Dissoziation der α -Untereinheit von $G_{\beta\gamma}$ kommt. Unabhängig voneinander können beide Untereinheiten verschiedene Signalkaskaden aktivieren. Durch die Dephosphorylierung von G_α kommt es zum Terminieren der Aktivierung von Signalkaskaden und zur Reassemblierung des heterotrimeren G-Proteins. Aufgrund der Stimulierung der Adenylatcyclase, vermittelt durch die G_α -Untereinheit, kann man inhibitorische und stimulatorische G_α -Untereinheiten ($G_{\alpha i}$ und $G_{\alpha s}$) unterscheiden. Die Adenylatcyclase katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP. cAMP aktiviert im Folgenden die Proteinkinase A (Braun and Kelsall, 2001). Pathogene Bakterien sind in der Lage, durch Toxine die G-Protein-vermittelten Signalwege zu ihrem Vorteil zu hemmen oder zu aktivieren und so die Immunantwort des Wirtes zu verändern. Cholera toxin beispielsweise hemmt die GTPase-Aktivität von $G_{\alpha s}$ (Braun and Kelsall, 2001), Pertussis toxin ist ein Inhibitor von $G_{\alpha i}$ (Braun and Kelsall, 2001) und *Pasteurella multocida* Toxin ist ein $G_{\alpha i}$ -Aktivator (Hildebrand *et al.*, 2012). Aufgrund der Eigenschaften dieser Toxine konnte nachgewiesen werden, inwieweit GPCR am *Crosstalk* mit TLR-Signalwegen beteiligt sind und welche Auswirkungen dieser *Crosstalk* hinsichtlich der Sekretion von Zytokinen hat. So wurde nachgewiesen, dass in humanen Monozyten und Dendritischen Zellen, die mit Cholera toxin behandelt und mit LPS stimuliert wurden, die Produktion von IL-12 und TNF α gehemmt war (Braun and Kelsall, 2001), die IL-10 Produktion jedoch erhöht und IL-6 unbeeinflusst blieb (Kraan *et al.*, 1995). Stimulatorische G_α sind also in der Lage, die TLR-induzierte Produktion von IL-12 und TNF α zu fördern. Pertussis toxin als Inhibitor der inhibitorischen G_α -Untereinheit kann die IL-12 Sekretion in LPS-stimulierten primären Monozyten fördern (Hildebrand *et al.*, 2012). MCP-1 (CCL2) und C5a (Anaphylatoxin) sind Agonisten von $G_{\alpha i}$ und in der Lage, die IL-12 Produktion in Monozyten zu hemmen (Braun and Kelsall, 2001). Ebenfalls hemmt das *Pasteurella multocida* -Toxin als Aktivator von $G_{\alpha i}$ die IL-12 Produktion (Hildebrand *et al.*, 2012). Hinter der Hemmung der IL-12 Sekretion in Monozyten sollen nach Hildebrand *et al.* zwei Mechanismen stecken. Zum einen kommt es durch die Aktivierung der $G_{\alpha i}$ -Untereinheit zu verminderter cAMP Bildung und damit zu verminderter Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Die PKA kann den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP Response Element-Binding Protein*) aktivieren (Hildebrand *et al.*, 2012), der die Transkription cAMP-abhängiger Gene, u.a. IL-10, ein Inhibitor der IL-12 Sekretion, fördert. Zum zweiten

kommt es durch die Aktivierung von $G_{\alpha i}$ zur Aktivierung der PI3K, die Akt phosphoryliert. Akt führt zur Phosphorylierung von JNK und JNK hemmt die Expression von *il-12* (Hildebrand *et al.*, 2012).

1.4 Zytokine

Nach TLR-Aktivierung durch PAMPs kommt es wie oben beschrieben zur Aktivierung von NF κ B, MAP Kinasen und folglich zur Transkription von Zytokinen und Chemokinen. Zytokine sind lösliche Proteine, die nach der Sekretion an Zytokinrezeptoren von Zellen binden und sowohl autokrin als auch parakrin Zellen des angeborenen aber auch des erworbenen Immunsystems auf bestimmte Art und Weise beeinflussen, so dass es durch Bindung von Zytokinen zu oxidativem Stress in Zellen oder zur weiteren Freisetzung anderer Zytokine kommt. Zytokine können aufgrund ihrer Struktur in Familien eingeteilt werden. Unter anderem unterscheidet man die Zytokinfamilie I und II, die TNF (*Tumor Necrosis Factor*) Familie und die IL-1 (*Interleukin-1*) Familie.

1.4.1 Zytokinfamilie I

Zur Zytokinfamilie I gehören unter anderem IL-6, die IL-12 Familie, GM-CSF und Erythropoetin. Charakterisiert sind diese Zytokine durch vier alpha-Helices. Klasse I Zytokine sind oftmals involviert in die Expansion oder Differenzierung von Gewebe (Huising *et al.*, 2006). Dabei ist GM-CSF wichtig für die Expansion von myeloiden Vorläuferzellen während der Aktivierung des Immunsystems, IL-4 und IL-12 für die Differenzierung von Th0 Zellen in Th2 bzw Th1 (Nelms *et al.*, 1999; Watford *et al.*, 2003).

1.4.1.1 Interleukin-6

IL-6 ist ein Glycoprotein, das von einer Vielzahl Immunzellen aber auch von Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen gebildet wird. IL-6 ist notwendig für die IL-21-Produktion durch T-Zellen, was dann die Differenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen anregt. IL-6 defiziente Mäuse produzieren nach einer Infektion weniger Immunglobulin G, wobei die Immunglobulin M-Produktion normal ist (Kopf *et al.*, 1994). Durch IL-6 kommt es ebenfalls zur Stimulierung von T-Zellen. Darüber hinaus ist IL-6 beteiligt an der Hämatopoese, durch Anregung der Proliferation pluripotenter Vorläuferzellen und Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen in Granulozyten und Makrophagen (Taga and Kischimoto, 1997). IL-6 wirkt ebenfalls auf Nicht-Immunzellen, indem es z.B. in der Leber die Produktion von C-reaktivem Protein, einem Akutphaseprotein, anregt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass IL-6 über die Bindung an den IL-6R

Jak/STAT3-abhängig die TLR-Expression steigern kann. Diese geschieht als positive Rückkopplung und soll dazu dienen, die Entzündungsantwort zu verstärken (Mansell and Jenkins, 2013). STAT3 und p65 können einen Transkriptionsfaktorkomplex bilden, der die Expression von RANTES (CCL5) induziert, welches STAT3 alleine nicht induzieren könnte (Yang *et al.*, 2007). Dieser positive Rückkopplungseffekt ist jedoch zelltypabhängig. In IL-6-defizienten Mäusen konnte nach LPS-induzierter Lungenentzündung gesteigerte Expression von TLR2 und TLR4 nachgewiesen werden. Jedoch konnte der Zelltyp, in dem es IL-6-abhängig zur verminderten Expression von TLRs kommt, nicht eindeutig bestimmt werden.

1.4.1.2 Interleukin-12

IL-12 ist ein heterodimeres Zytokin, das aus einer α -Kette (p35, gehört zur Zytokinfamilie I) und einer β -Kette (p40) besteht. Beide Untereinheiten sind kovalent miteinander verbunden und bilden das aktive IL-12 (IL-12p70). IL-12 wird von antigenpräsentierenden Zellen durch mikrobielle Stimuli induziert und sekretiert. IL-12 induziert die Sekretion von IFN γ durch T-Zellen und natürlichen Killerzellen und ist damit ein wichtiger Faktor für die Ausbildung der Th1 Antwort. IL-12 wirkt proinflammatorisch und prostimulatorisch (Vignali and Kuchroo, 2012).

1.4.2 Zytokinfamilie II

Zur Klasse II Zytokine gehört die IL-10 Familie und die IFN Familie (Typ I und II IFN) (Pestka *et al.*, 2004). Die IL-10 Familie kann aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen weiter unterteilt werden in drei Subklassen. Zu der ersten Subfamilie gehört IL-10, das hauptsächlich die exzessive Immunantwort unterdrückt. Die zweite Gruppe ist die IL-20 Subfamilie, zu der die Zytokine IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 und IL-26 gehören (Sa *et al.*, 2007). Diese Zytokine wirken in erster Linie auf verschiedenste Epithelzellen. Sie induzieren die Sekretion von antimikrobiellen Chemokinen wie Defensinen und C-Typ Lektin, um sie vor der Invasion extrazellulärer Erreger zu schützen und unterstützen Wundheilungsprozesse sowie die Wiederherstellung von geschädigtem Gewebe durch Anregen der Proliferation und Hemmung der Apoptose (Ouyang *et al.*, 2011). Die dritte Subfamilie ist die Typ III IFN Gruppe (IFN- λ), zu der die Zytokine IL-28A, IL-28B und IL-29 gehören (Fox *et al.*, 2009). Diese Zytokine induzieren ähnliche antivirale Immunantwort wie Typ I IFN, wirken aber hauptsächlich auf Epithelzellen (Uze and Monneron, 2007). Zusammen mit Typ I IFN verstärken sie die antivirale Immunantwort. Die zentrale Funktion der IL-10 Familie ist ihre Rolle im Schutz des Gewebes des Organismus, dabei verhindern sie sowohl exzessiven Gewebeschaden als auch ein Überschießen der Immunantwort (Ouyang *et al.*, 2011). Klasse II Zytokine sind im

Gegensatz zu Klasse I Zytokinen daran beteiligt, den Schaden für den Organismus nach einer Infektion zu minimieren (Krause and Pestka, 2005).

1.4.2.1 Interleukin-10

IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, das zuerst 1989 beschrieben wurde. Es unterdrückt inflammatorische und autoimmune Reaktionen. Obwohl das Fehlen von IL-10 meistens zu einer besseren Beseitigung von Erregern führt, kann es auch zu chronisch entzündlichen Erkrankungen führen (z.B. kann die IL-10 *knockout* Maus Colitis entwickeln). Das zeigt, dass die Funktion von IL-10 von keinem anderen Zytokin übernommen werden kann und IL-10 damit nicht redundant ist (Saraiva and O'Garra, 2010). IL-10 wird sowohl von Zellen des adaptiven Immunsystems (unter anderem Th1, Th2, regulatorischen T-Zellen und B-Zellen) als auch von Zellen der angeborenen Immunität, unter anderem von DCs, M Φ , natürlichen Killerzellen (NK) und PMNs gebildet. Es verstärkt die Differenzierung von IL-10-sekretierenden regulatorischen T-Zellen und hindert DCs daran, Th1 zu aktivieren. Des Weiteren führt IL-10 zur Abschwächung der Entzündungsreaktion durch Hemmung der Makrophagenaktivierung (O'Farrell *et al.*, 1998). Die ERK- und p38-abhängige IL-10 Produktion kann durch IFN γ gehemmt werden. Neben der direkten Hemmung der MAPK führt IFN γ auch zur Aktivierung von GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 β*) durch die Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges (Hu *et al.*, 2006). Dadurch wird die Bindung von AP-1 (*Activator Protein*) an den IL-10 Promotor inhibiert und die IL-10 Produktion unterdrückt (Hu *et al.*, 2006). IL-10 kann durch IL-10 selbst reguliert werden, zum einen negativ durch Aktivierung von DUSP1 (*Dual Specificity Phosphatase 1*) und nachfolgender p38-Inaktivierung, wodurch die IL-10-Produktion gehemmt wird (Hammer *et al.*, 2005). Die Regulation kann aber auch positiv sein durch die Hochregulierung von Tpl2 (*Tumor Progression Locus 2*), wodurch eine positive Rückkopplungsschleife für die IL-10-Produktion entsteht (Lang *et al.*, 2002). Ebenfalls wurde beschrieben, dass IL-10 seine eigene Transkription STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transkription 3*)-abhängig durch Hochregulierung von Tpl2 und damit verbundener ERK (*Extracellular Signal Regulated Kinase*)-Aktivierung induziert (Staples *et al.*, 2007). Durch die Aktivierung des Jak/STAT-Signalwegs, besonders STAT3 wird auch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch IL-10 unterdrückt (Takeda *et al.*, 1999).

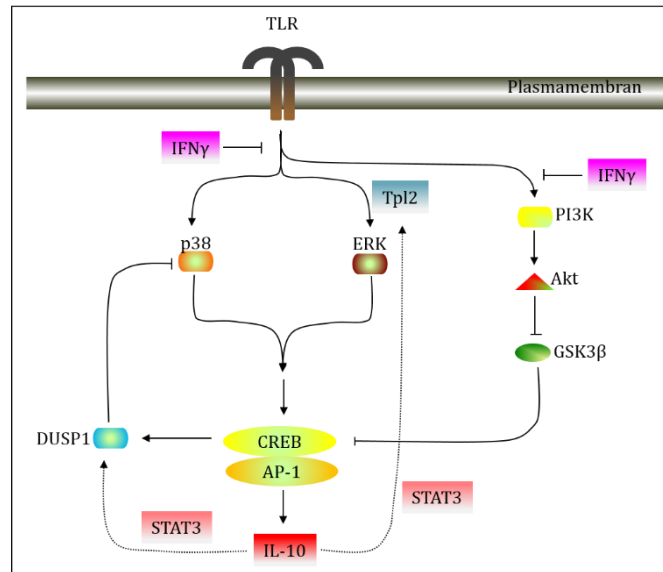


Abb. 1.5: Positive und negative Rückkopplungen für die Regulation von IL-10. TLR-abhängige Signale aktivieren MAPK, die die IL-10 Expression aktivieren, was durch IFN γ und IL-10 unterdrückt werden kann. IFN γ kann des Weiteren mit dem PI3K-Signalweg interferieren und die Akt-vermittelte Inaktivierung von GSK3 β aufheben. IL-10 unterliegt einer autokrinen positiven Regulation durch Aktivierung von STAT3 und Aktivierung von Tpl2. (nach Saraiva and O'Garra, 2010).

1.4.3 TNF Zytokinfamilie

Die Mitglieder der TNF (*Tumor Nekrosis Faktor*) Zytokinfamilie sind trimere lösliche Proteine wie TNF α und TNF β und Oberflächenproteine wie Fas-Ligand oder RANKL (*Receptor Activator of NF κ B Ligand*). Sie zeigen Sequenzhomologien hauptsächlich im Bereich, der für die Trimerisierung verantwortlich ist. Im Gegensatz zu ihrer Strukturähnlichkeit zeigen Mitglieder der TNF Zytokinfamilie teilweise gegensätzliche biologische Funktionen. TRAIL (*TNF Related Apoptosis Inducing Ligand*) und Fas-Ligand induzieren hauptsächlich Apoptose, wobei CD40-Ligand Apoptose verhindert und die Zellproliferation antreibt.

1.4.3.1 TNF α

TNF α wird zunächst als Pro-Form gebildet. Pro-TNF α liegt membrangebunden vor und wird von TACE (*TNF- α -Converting Enzyme*) in die aktive Form gespalten. TACE ist eine Protease, die zur ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*)-Familie gehört und ebenfalls membrangebunden vorliegt (Itai *et al.*, 2001). TNF α wird von einer Vielzahl von Zellen als Antwort auf eine Entzündung produziert. Dazu gehören Makrophagen und Lymphozyten, aber auch Keratinozyten und Fibroblasten. Durch die Ausschüttung von TNF α kommt es zur Aktivierung und Migration von Lymphozyten und Leukozyten, zur Ausschüttung von Akutphaseproteinen und Fieber, zur Zellprolife-

ration, Zelldifferenzierung und Apoptose (Tracey and Cerami, 1993). TNF α kann an zwei unterschiedliche Rezeptoren, TNFR1 (*TNF Receptor 1*) und TNFR2 (*TNF Receptor 2*) binden. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor führt zur Trimerisierung des Rezeptors und zur Rekrutierung von spezifischen Adaptermolekülen. Die unterschiedlichen Effekte von TNFR1 und TNFR2 werden durch Aktivierung unterschiedlich rekrutierter Adaptermoleküle hervorgerufen. Zum einen wird an den TNFR1 TRADD (*TNFR1 Associated DEATH Domain*) rekrutiert, woran RIP1 (*Receptor Interacting Protein 1*), TRAF2 oder FADD binden können. Hierbei führt die Bindung von RIP1 und TRAF2 zur Aktivierung von NF κ B. FADD hingegen hat apoptotische Effekte. Auch an den TNFR2 bindet TRAF2 und führt zur Aktivierung von NF κ B (Baud and Karin, 2001). TNF α -Signalwege haben ebenfalls Einfluss auf die Morphologie der Zelle. So konnte gezeigt werden, dass TNF α -Aktivierung von Fibroblasten zunächst die Rho GTPase Cdc42 aktivieren, wodurch es zur Ausbildung von Filopodien kommt. Im Folgenden wurde auch die Aktivierung der Rho GTPasen Rac1 und RhoA beobachtet (Puls *et al.*, 1999). TNF α -stimulierte Endothelzellen rekrutieren aktives Rac1 und NOX2 (*NADPH Oxidase 2*) zur Spitze von Zellprotrusionen, wodurch es zu Veränderungen des Zytoskeletts kommt. Dabei spielt die Bildung von ROI eine Rolle, denn werden ROI beseitigt, kommt es nicht mehr zur Migration von Endothelzellen. Somit können TNF α -Signalwege zur Produktion von ROI führen (Van Buul *et al.*, 2005; Mathew *et al.*, 2009).

1.5 Rho GTPasen

Rho (*Ras Homologue Proteins*) GTPasen gehören zur Superfamilie der Ras (*Rat sarcoma*)-verwandten kleinen GTPasen. Sie kommen in allen eukaryotischen Zellen vor und fungieren als intrazelluläre Regulatoren in diversen Signalwegen (Van and Souza-Schorey, 1997). Die ersten Untersuchungen der drei wichtigsten Mitglieder der Familie der Rho GTPasen RhoA (*Ras Homologue Gene Family Member A*), Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) und Cdc42 (*Cell Division Cycle 42*) haben gezeigt, dass sie eine wichtige Funktion in der Regulation des Zytoskeletts haben (Hall, 1998). So ist eine Aktivierung von RhoA verantwortlich für die Induzierung von Stressfasern, aktives Rac1 bewirkt Lamellipodienbildung (und *membrane ruffles*) und Cdc42 führt zur Bildung von Filopodien (Hall, 1998). Des Weiteren haben Rho GTPasen u.a. Funktionen während der Zellteilung, der Migration und Adhäsion und der Transkription. Eine Auflistung über die Funktionen ist in Abb 1.6 dargestellt.

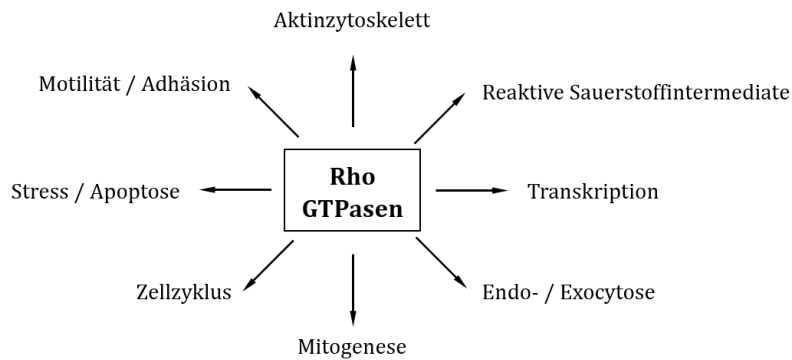


Abb. 1.6: Die Funktion der Rho GTPasen in der Zelle. Rho GTPasen sind an unterschiedlichsten zellulären Prozessen beteiligt. (nach DerMardirossian and Bokoch, 2001).

Die Familie der Rho GTPasen umfasst 23 Proteine (Tybulewicz and Henderson, 2009). Aufgrund der Sequenzähnlichkeit können die Proteine, wie in Abb 1.7 dargestellt, in sieben Subfamilien eingeteilt werden. Dabei gehören die bekanntesten Vertreter RhoA, Rac1 und Cdc42 zu jeweils einer eigenen Subfamilie (Rho-ähnlich, Rac-ähnlich und Cdc42-ähnlich). Des Weiteren gibt es die Subfamilie der Rnd (*Rho-related GTP-binding Protein Family*)-ähnlichen und der RhoBTB (*BTB-Broad Complex/Tramtrack/Bric-a-brac Domain*)-ähnlichen GTPasen. Diese sind insofern atypische GTPasen, dass sie im Gegensatz zu den Rho GTPasen überwiegend mit GTP gebunden vorliegen und wahrscheinlich über Wege der Expression, Phosphorylierung oder Stabilität reguliert werden (Chardin, 2006; Tybulewicz and Henderson, 2009). Die Funktion der atypischen Rho GTPasen ist noch nicht vollständig geklärt. Für RhoBTB ist eine mögliche Rolle als Tumorsuppressor beschrieben (Hamaguchi *et al.*, 2002). RhoBTB bildet mit Cullin3 und Rbx1 (*Ringbox protein 1*) einen Komplex, der als Ubiquitin-E3-Ligase fungiert, wobei bislang nicht bekannt ist, welche Substrate ubiquitinyliert werden (Wilkins *et al.*, 2008). Von Rnd Proteinen ist bekannt, dass sie an der Regulierung des Zytoskeletts beteiligt sind (Chardin, 2006). In Fibroblasten und Epithelzellen z.B. sind Rnd Rho GTPasen mit Cadherinen in Desmosomen co-lokalisiert, jedoch ist nicht bekannt, ob sie hier eine aktivierende oder inaktivierende Funktion haben.

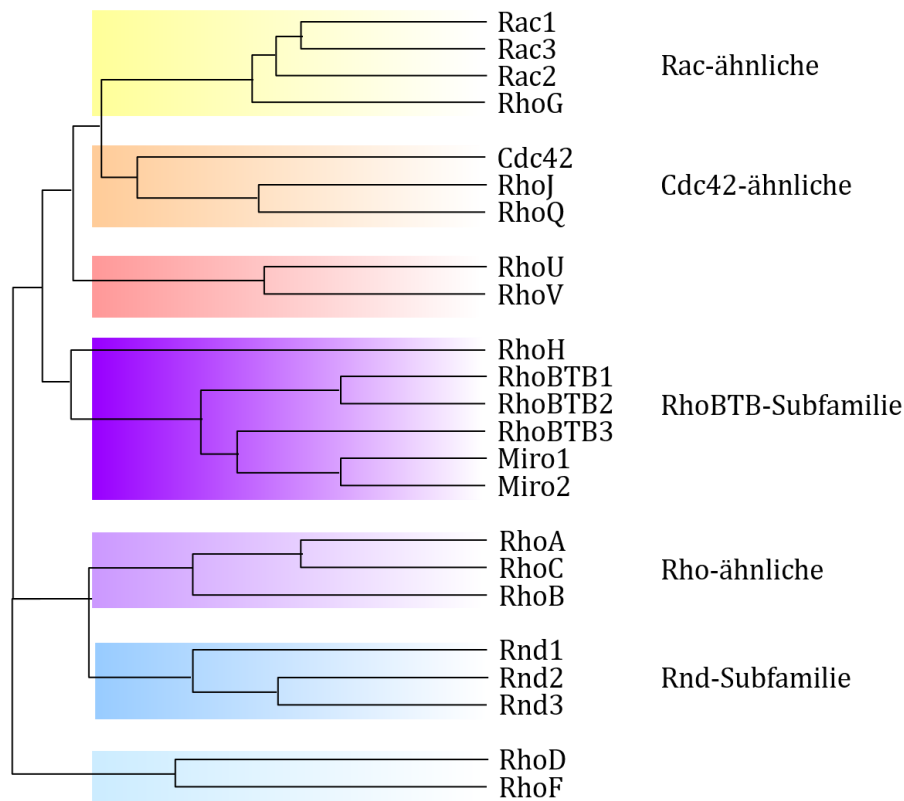


Abb.1.7: Die Familie der Maus Rho GTPasen mit Verwandtschaftsbeziehungen. Der Phylogenetische Baum zeigt die 23 Mitglieder der Maus GTPasen. (nach Tybulewicz and Henderson, 2009).

Rho GTPasen fungieren als molekulare Schalter. Sie haben einen aktiven und einen inaktiven Zustand, wobei sie im inaktiven Zustand GDP gebunden haben. GDP gebundene Rho GTPasen sind entweder durch eine Bindung an *Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors* (GDI) im Zytosol lokalisiert oder ohne GDI-Assoziation an der Membran durch Prenylreste (Geranylgeranylrest) verankert (Seabra, 1998), was die Voraussetzung für ihre Aktivierung ist (Olofsson, 1999). Die Aktivierung geschieht durch *Guanine Nucleotide Exchange Factors* (GEFs) nach einer Stimulierung von Oberflächenrezeptoren. GEFs katalysieren den Austausch von GDP zu GTP. Hierdurch wird die Rho GTPase angeregt und interagiert mit einer Vielzahl von Effektoren. Die Rho GTPasen können sich durch ihre GTPase Aktivität selbst inaktivieren. Zusätzlich kann die Hydrolyse von GTP zu GDP durch *GTPase Activating Proteins* (GAPs) beschleunigt werden. Für eine GTPase gibt es mehrere GEFs (79 identifizierte GEFs für Rho GTPasen) und GAPs (65 GAPs), die gewebe- oder entwicklungspezifisch exprimiert sein können (Tybulewicz and Henderson, 2009) und spezifisch reguliert werden (Moon and Zheng, 2003).

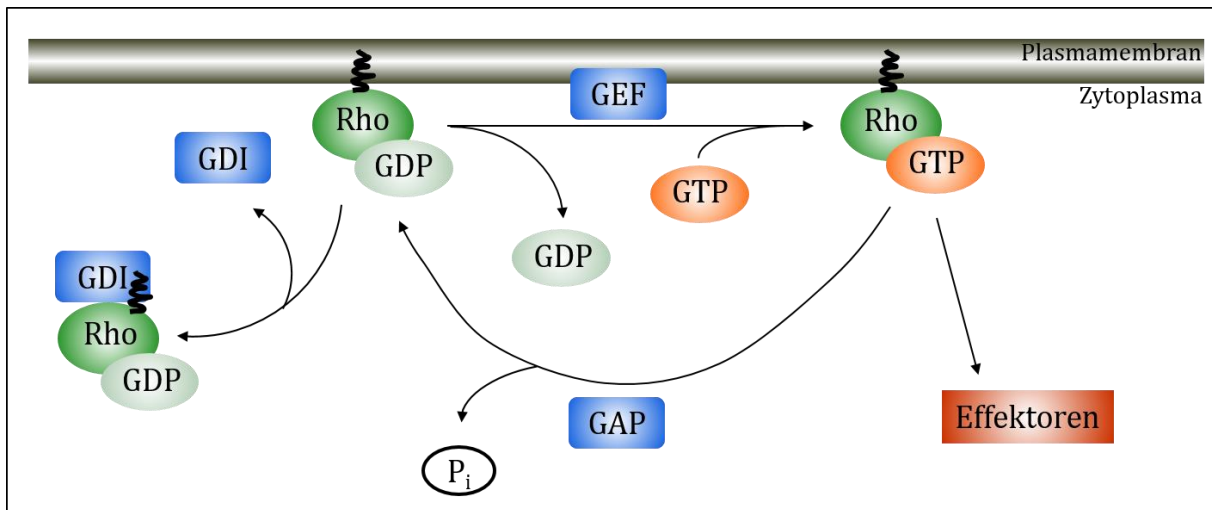


Abb. 1.8 Aktivierungs- und Inaktivierungszyklus von Rho GTPasen. Der Austausch von GDP zu GTP erfolgt an membrangebundenen Rho GTPasen durch GEFs, was das Aktivieren von Effektorproteinen nach sich zieht. Die Inaktivierung der GTPasen erfolgt durch GAPs und GDIs, die die Bindung der GTPase an die Membran unterdrücken. (nach Tybulewicz and Henderson, 2009).

1.5.1 Rho GTPasen in TLR-Signalwegen

Rho GTPasen werden durch Signalwege von unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren aktiviert (Kjoller and Hall, 1999). So führt auch die Bindung von TLR-Agonisten zur Aktivierung von Rac1, RhoA und Cdc42 (Arbibe *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 2002, Teusch *et al.*, 2004, Equils *et al.*, 2004). Dabei werden die drei GTPasen schnell aber kurzlebig aktiviert. So wurde von der Gruppe um Ulla Knaus gezeigt, dass Rac1 in den TLR2-Signalweg involviert ist (Arbibe *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurden Zellen einer humanen Monozytenzelllinie (THP-1) sowie transfizierte HEK293 Zellen (*Human Embryonic Kidney Cells*) zunächst mit hitzeinaktiviertem *Staphylococcus aureus* (HKSA), der TLR2-Aktivität hat, stimuliert. Darauf kam es zum Anstieg der Rac1- und Cdc42-Aktivität, wobei die Rac1-Aktivität in Zusammenhang mit der TLR-abhängigen Aktivierung von NFκB stand, was für Cdc42 nicht gezeigt wurde. Um die Aktivierung von NFκB zu bestimmen, wurden HEK293 Zellen mit einem NFκB-abhängigen Luciferasereporterplasmid transfiziert. Neben dem NFκB-Reporterplasmid wurden Zellen mit inhibitorischen Plasmiden transfiziert, auf denen die p21-bindende Domäne (PBD) von Pak1 kodiert ist, wodurch es zur Blockade des aktiven Cdc42 und Rac1 kommt, sowie zur Hemmung von Pak. Das zeigt, dass die NFκB-Aktivierung bei der Hemmung des Rac1/Cdc42-Signalweges stark zurückgeht. Eine Co-Transfektion mit dominant negativen Konstrukten für Rac1 (Rac1N17) und Cdc42 (Cdc42N17) wies nur bei der Transfektion mit Rac1N17 eine geringere NFκB-Luciferaseaktivität nach Stimulierung mit HKSA auf. Des Weiteren führte die Co-Transfektion mit konstitutiv aktivem Rac1 (Rac1V12) zu einer stärkeren Luciferaseaktivität. Neben der Beteiligung von Rac1 am TLR2-Signalweg wurde ebenfalls beschrieben, dass die PI3K als Effektor von Rac1 am TLR2-Signalweg beteiligt ist. Hierzu wurden ebenfalls HEK293 Zellen

entweder mit den pharmakologischen PI3K-Hemmern Wortmannin und Ly294002 präinkubiert oder mit einem dominant negativen p85-Konstrukt (p85DN), der regulatorischen Untereinheit der PI3K, co-transfiziert. Eine HKSA-Stimulierung führte in allen Fällen zu geringerer NFκB-abhängigen Luciferaseaktivität. Des Weiteren konnte durch die Rac1-Immunpräzipitation in HKSA-stimulierten THP-1 und HEK293 Zellen nachgewiesen werden, dass die Stimulierung von TLR2 zur Bildung eines Komplexes aus TLR2, p85 und Rac1 führt, der notwendig für die Aktivierung von NFκB ist. Auch für RhoA wurde eine Rolle im TLR2-Signalweg beschrieben (Teusch *et al.*, 2004). Hierzu wurden THP-1 Zellen sowie HEK293 Zellen mit einem NFκB-abhängigen Reporterplasmid transfiziert, um durch die Bestimmung der Luciferaseaktivität Rückschlüsse auf die NFκB-Aktivierung ziehen zu können. Mit einem dominant negativen RhoA-Konstrukt (RhoAN19) co-transfizierte Zellen zeigten geringere Luciferaseaktivität als mit RhoA co-transfizierte Zellen. Die Aktivierung von RhoA in HKSA-stimulierten Zellen führt zur Interaktion mit der atypischen Proteinkinase Cζ (PKCζ), wodurch es zur Phosphorylierung von p65 an S311 kommt. Diese Aktivierung von NFκB ist notwendig für die Interaktion mit CREB (Duran *et al.*, 2003). Eine Hemmung der PI3K mit Wortmannin in HEK293 oder THP-1 Zellen und anschließende Stimulierung mit HKSA hatte keinen Effekt auf die RhoA-Aktivierung. Der Einfluss auf die NFκB-Aktivität wurde nicht gezeigt. Für RhoA wurde ebenfalls eine Interaktion mit dem TLR4-vermittelten Signalweg beschrieben (Chen *et al.*, 2002). In humanen Monozyten wurde ein Anstieg der RhoA-Aktivität nach Stimulierung mit LPS beschrieben. Des Weiteren wurde gezeigt, dass es durch die Hemmung von RhoA, RhoB und RhoC durch das C3 Exoenzym aus *C. botulinum* (ADP-Ribosyltransferase) nicht mehr zu einer LPS-induzierten Aktivierung von NFκB kommt. Verifiziert wurde diese Aussage durch mit RhoAN19 und einem IL-8-abhängigen Luciferasereporterplasmid transfizierten THP-1 Zellen, die nach LPS-Stimulierung RhoAN19-konzentrationsabhängig kaum Luciferaseaktivität aufweisen. Im Vergleich dazu führte die Transfektion von THP-1 Zellen mit RhoAQ63L, dem konstitutiv aktivem Konstrukt und dem IL-8-abhängigen Reporterplasmid zu einem verstärkten Luciferasesignal. Für den TLR4-Signalweg konnte in der humanen Endothelzelllinie HMEC (*Human Dermal Microvessel Endothelial Cells*) Rac1-Abhängigkeit festgestellt werden (Equils *et al.*, 2004). Mit Rac1N17 und HIV-LTR (*Human Immunodeficiency Virus-Long Terminal Repeat*)-Luciferase co-transfizierte HMEC zeigten Rac1N17-konzentrationsabhängig geringere Luciferaseaktivität nach LPS-Stimulierung, wohingegen Rac1V12 zu einer stärkeren Luciferaseaktivität führt. Bei dieser Studie machte man sich zu Nutze, dass Bindung von zellulären Transkriptionsfaktoren, u.a. NFκB, an die LTR die HIV-Replikation fördert. Im Gegensatz zu den beschriebenen Daten, die Rho GTPasen als positive Regulatoren der TLR-Signalwege zeigen, wurden auch Ergebnisse veröffentlicht, die Rho GTPasen als negative Regulatoren der TLR-vermittelten Signalwege darstellen. Beispielsweise führt die Hemmung der HMG-CoA (*3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A*)-Reduktase durch Lovastatin in RAW 264.7 Zellen nach LPS-Stimulierung zur gesteigerten Sekretion von TNFα (Monick *et al.*, 2003). Die HMG-CoA-Reduktase ist für die Biosynthese von Geranyl-

und Farnesylpyrophosphat erforderlich, die zur Farnesylierung oder Geranylgeranylierung der Ras GTPase Familie benötigt werden. Die Hemmung der HMG-CoA Reduktase führt zu 50%igem Abfall der Prenylierung von Rho GTPasen verglichen mit Zellen ohne Lovastatinbehandlung. Ohne Prenylierung können die GTPasen nicht stabil an die Zytoplasmamembran binden. Durch Hemmung der Rho GTPasen-Prenylierung kommt es nach LPS-Stimulierung zu einer verlängerten Aktivierung von ERK, was die verstärkte Sekretion von TNF α nach sich zieht. Die negative Regulation des TLR-Signalwegs ist auch in Borysiewicz *et al.*, 2009 beschrieben. Nach Hemmung der Rho GTPasen in Astrozyten mit Toxin B aus *Clostridium difficile* kommt es nach Stimulierung mit TLR2-, TLR3- oder TLR4-Agonisten zum Konzentrationsanstieg der sekretierten Zytokine IL-6, IL-1 β und TNF α . Eine direkte Interaktion zwischen Rac1 und TLR2 konnte 2000 von Arbibe *et al.* gezeigt werden. Im Komplex ist ebenfalls die regulatorische Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase p85 und MyD88. Sie können entweder positive oder negative Regulatoren der TLR-Signalkaskade abhängig von Rezeptor oder Zelltyp sein (Monick *et al.*, 2003; Borysiewicz *et al.*, 2009).

1.5.2 Rho GTPasen und reaktive Sauerstoff-Intermediate (ROI) in TLR-induzierter NF κ B Aktivierung und Zytokinseznierung

ROI können die NF κ B-Signalwege sowohl aktivieren als auch hemmen (Morgan and Liu, 2011). Werden RAW 264.7 Makrophagen mit LPS stimuliert, kommt es zur NF κ B-abhängigen Sekretion von TNF α . Durch die Stimulierung mit LPS kommt es nach Sanlioglu *et al.*, 2001 zunächst zu einer Aktivierung von Rac1, was dann zur Bildung von ROI führt. Wurden Zellen mit Antioxidantien behandelt, konnte eine verminderte NF κ B-Aktivität nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass NF κ B Rac1- und ROI-abhängig aktiviert werden kann. Neben der ROI-abhängigen NF κ B Aktivierung konnte von Miletic *et al.*, 2007 auch gezeigt werden, dass es in LPS (Lipopolysaccharid)-stimulierten Knochenmarkmakrophagen ROI-abhängig zur Aktivierung der MAPK p38 und ERK kommt. Die Bildung der ROI und damit die Aktivierung der MAPK war Vav- und Rac-abhängig. Eine Stimulierung von Vav *knockout* Makrophagen mit LPS führte zu verminderter Sekretion von TNF α und IL-10 in den Kulturüberstand. Die Konzentration von IL-6 blieb unverändert verglichen zum wt (Miletic *et al.*, 2007). Negativ wirkt die ROI-vermittelte Oxidation von IKK β an Cys179 auf das NF κ B-Signal (Reynaert *et al.*, 2006). Die Oxidation führt zur Inaktivierung der Kinaseaktivität von IKK β , wodurch es zu verminderter NF κ B-Signalstärke kommt. Des Weiteren ist beschrieben, dass die Proteinkinase Akt, die über mTOR und Raptor die Aktivierung von NF κ B vermittelt, ROI vermittelt oxidiert werden kann. Bei der Oxidation von Akt bildet sich eine Disulfidbrücke zwischen den Cys 297 und Cys311, wodurch die Kinasefunktion von Akt und damit die Aktivierung der IKK gehemmt wird (Murata *et al.*, 2003) und es damit nicht zur Aktivierung von NF κ B kommt.

1.6 Konditionale *Knockout* Mäuse

Die Möglichkeit, Mäuse durch das gezielte Ausschalten oder Einbringen von DNA Sequenzen zu manipulieren, ermöglicht die Untersuchung von Proteinfunktionen *in vivo*. Zum Beispiel konnte durch den gezielten *Knockout* von Toll-Like Rezeptoren ihre spezifische Funktion ermittelt werden (Akira, 2000). Einige genetische Veränderungen können jedoch letal sein, da Proteine in der Embryonalphase eine nicht redundante Funktion haben. Ihre Funktion im adulten Organismus kann dadurch nicht mehr untersucht werden. Um das zu umgehen, können Gene unter bestimmten Bedingungen, z.B. gewebespezifisch manipuliert werden. Hierzu macht man sich das Cre/loxP-System zu Nutze (Lewandoski, 2001). Cre ist eine Phagenrekombinase, die spezifisch loxP-Sequenzen erkennt (Misra and Duncan, 2002). Sind Gene oder Genbereiche mit loxP-Sequenzen flankiert, was als „gefloxt“ bezeichnet wird, kann es durch Rekombination zur gezielten Deletion oder zur Umkehrung des Leserasters (Inversion) dieser Bereiche kommen, was als konditionaler *Knockout* bezeichnet wird (Lewandoski, 2001, Misra and Duncan, 2002) (Abb. 1.9). Ist die Cre-Rekombinase einem gewebespezifischen Promotor nachgeschaltet, geschieht die Rekombination spezifisch in diesem Gewebe. 1999 beschrieb die Gruppe um I. Förster eine Maus mit einer Insertion der *cre* cDNA in den endogenen Lysozym M (*LysM*) Lokus (Clausen *et al.*, 1999). Cre-vermittelte Deletionen von Rho GTPasen wurden u.a. in Keratinozyten (Pedersen *et al.*, 2012), Neuronen (Cappello *et al.*, 2012) oder Osteoklasten (Croke *et al.*, 2011) beschrieben. Die meisten Untersuchungen zum Einfluss der Rho GTPasen in bestimmten Zelltypen oder Geweben wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf das Zytoskelett durchgeführt (Pedersen and Brakebusch, 2012). Dabei lag besonderes Augenmerk auf Veränderungen von Zell-Zell-Kontakten, Veränderungen von Ausbildung von Protrusionen oder Veränderungen der Zellpolarität. Unterschiede konnten sowohl im Verhalten der GTPase-*knockout* Zellen zwischen *in vivo* und *in vitro* Versuchen festgestellt werden, als auch in der Cross-Regulierung von GTPasen untereinander. So ist die Rac1-Aktivität in Linseneithelzellen mit RhoA Depletion erhöht. Dieser Effekt wurde auch umgekehrt in Rac1 depletierten Zellen hinsichtlich der RhoA Aktivität festgestellt (Plageman *et al.*, 2011). In Keratinozyten hingegen führte die RhoA Deletion zu reduzierter Aktivität von Rac1 und Cdc42, jedoch konnte dieser Effekt nur *in vitro* festgestellt werden (Pedersen *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung des Einflusses von Rho GTPasen in Makrophagen konditionale GTPase-*knockout* Mäuse verwendet. Diese wurden unter Verwendung von *LysMCre* Mäusen und Mäusen mit „geflochten“ GTPase Bereichen so verpaart, dass beide Allele in den Tieren homozygot vorliegen (Wölke, S. 2011). In *LysMCre* Mäusen ist die Cre-Rekombinase dem *LysM*-Promotor nachgeschaltet, der nur in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert sein sollte. Um auszuschließen, dass durch die Cre-Rekombinase unspezifisch Gene oder Genbereiche deletiert werden, wurden Makrophagen der *LysMCre* Mäuse als Wild Typ Kontrollzellen verwendet, die im Folgenden als wt bezeichnet werden.

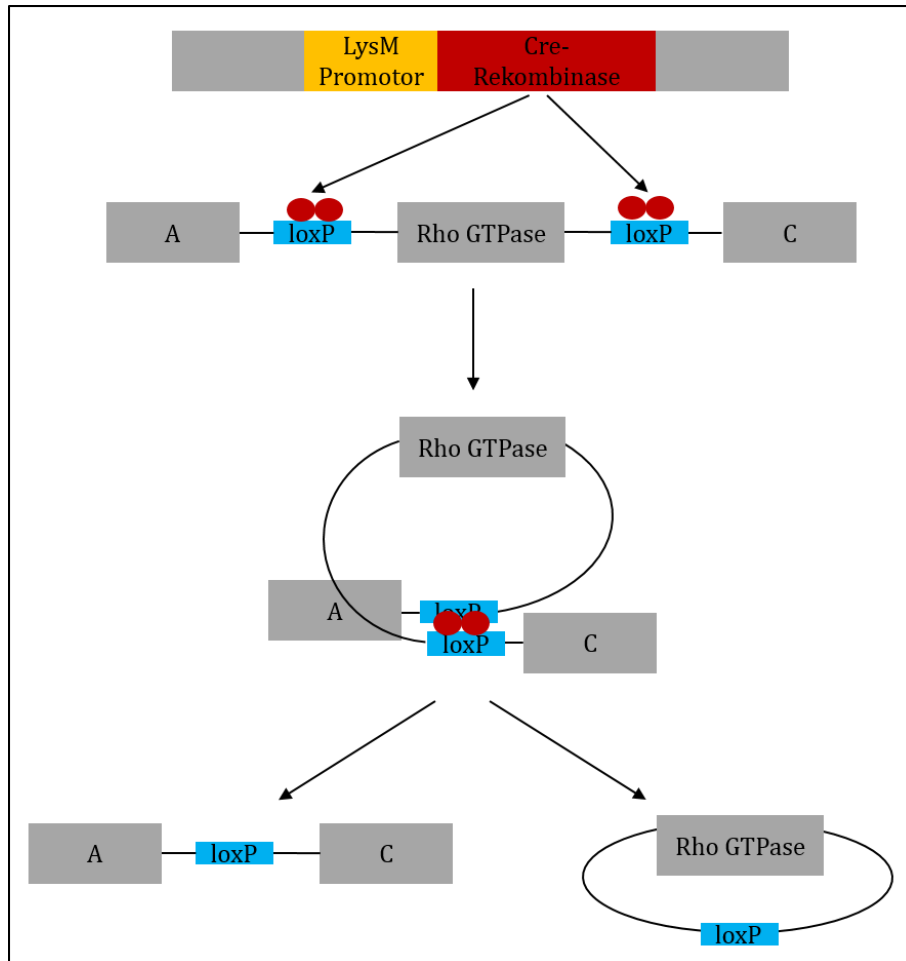


Abb. 1.9: Schematische Darstellung einer gezielten Gendelektion durch die Cre-Rekombinase in einer konditionalen *Knockout* Maus. Die Cre-Rekombinase ist dem LysM-Promotor nachgeschaltet, wodurch sie nur in bestimmten Geweben und Zellen exprimiert wird. loxP flankierte Bereiche werden von Rekombinasedimeren erkannt und die Rekombination dieser Bereiche katalysiert. Nachfolgend kommt es zur Deletion des „geflochten“ Genabschnitts. (nach Lewandoski, 2001).

1.7 Immortalisierte HoxB8 Zellen

Zur Untersuchung von intrazellulären Vorgängen ist die Zellkultur ein hilfreiches und notwendiges Werkzeug. Dabei können primäre Zellen durch die Ähnlichkeit zur *in vivo* Situation ein anderes Bild widerspiegeln als entartete isolierte Krebszellen z.B. HeLa Zellen. Der Nachteil der primären Zellen gegenüber beispielsweise HeLa Zellen ist ihre begrenzte Teilungsfähigkeit sowie die Tatsache, dass nur eine begrenzte Anzahl von primären Zellen, z.B. hämatopoetische Stammzellen aus einem Organismus isoliert werden können. In dieser Arbeit wurden primäre hämatopoetische Stammzellen verwendet und zu Makrophagensubtypen differenziert. Im Jahr 2006 wurde eine Methode beschrieben, bei der die Fähigkeit der *Hox*-Gene genutzt wird, hämatopoetische Stammzellen in einem bestimmten Differenzierungszustand einzufrieren (Wang *et al.*, 2006). Um die Expression der *Hox*-Gene an- und abzuschalten, wurde der Östrogenrezeptor an HoxB8 fusioniert,

wodurch bei Zugabe von Östrogen die Differenzierung angehalten wird, jedoch nicht die Proliferation. Nach Wegnahme dieses Stimulus werden *Hox*-Gene nicht mehr exprimiert, wodurch die normale Differenzierung der Zellen ablaufen kann. Mit dieser Methode konnten immortalisierte Makrophagen und neutrophile Granulozyten generiert werden (Wang *et al.*, 2006, Rosas *et al.*, 2011). Die primären generierten Makrophagen wurden in der vorliegenden Arbeit mit den immortalisierten Makrophagen verglichen.

1.8 Ziel und Fragestellung der Arbeit

Rho GTPasen spielen eine wichtige Rolle als Regulatoren von Zytoskelettlagerungen bei Zellmigration, Adhäsion und Phagozytose von Mikroorganismen. Darüber hinaus sind sie auch beteiligt an der Modulation der TLR-Signalkaskade. Unter Berücksichtigung dieser vielfältigen Rho GTPase-Funktionen ist es nicht verwunderlich, dass zahlreiche mikrobielle Pathogenitätsfaktoren die Aktivität von Rho GTPasen modulieren und so Zellen des Immunsystems zu Gunsten der Erregerstrategie kontrollieren. Diese Pathogenitätsfaktoren sind Moduline und Toxine, die durch Mimikri die Funktion von zellulären GEFs und GAPs nachahmen und somit die Rho GTPasen enzymatisch modulieren. Sie können von Bakterien direkt über Sekretionssysteme in die Wirtszelle injiziert werden, wodurch Bakterien in der Lage sind, Funktionen der Rho GTPasen zu ihrem Vorteil zu verändern. Zellen des Immunsystems erkennen PAMPs durch die Expression unterschiedlichster PRR. TLRs als spezifische Mustererkennungsrezeptoren sind entscheidend für das erfolgreiche Etablieren einer Immunantwort. Durch Beeinflussung der Funktion von Rho GTPasen können Bakterien wahrscheinlich auch die TLR-Signalwege modulieren. Die Rolle der Rho GTPasen im Zusammenhang mit TLR-Signalwegen wurde bisher für verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Methoden untersucht und hat zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb an primären Knochenmarkmakrophagen, die von Mäusen mit Gendelektionen in *Rac1*, *RhoA*, *Rac1/RhoA* oder *Cdc42* stammen, vergleichend die Zytokinantwort nach TLR2-, TLR4- bzw. TLR9-Aktivierung analysiert werden, um den Rho GTPase-Beitrag an TLR-Signalwegen zu ermitteln. Hierfür wurden konditionale Rho GTPase-*knockout* Mäuse durch Kreuzung von LysMCre Mäusen mit „geflochten“ $Rac1^{fl/fl}$, $RhoA^{fl/fl}$ bzw. $Rac1^{fl/fl}/RhoA^{fl/fl}$ hergestellt. Zusätzlich wurde die LysM-eGFP Expression von Knochenmarkzellen im Differenzierungsmedium mit M-CSF bzw. GM-CSF bis zur terminalen Makrophagendifferenzierung verfolgt, um so die LysMCre Expressionsdynamik über die Differenzierungszeit darzustellen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Tab. 2.1: Auflistung verwendeter Laborgeräte.

<u>Verwendete Laborgeräte</u>	<u>Firma</u>
Abi Prism® 7000	applied Biosystems, life technologies, Darmstadt
BD FACSCanto™ II	BD, Heidelberg
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE Mini PROTEAN 2®	BioRad, München
Eppendorf Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5810R, Rotor A-4-63	Eppendorf, Hamburg
Filmentwickler Fujifilm FPM 100A	Fuji, Düsseldorf
Fluoreszenzmikroskop Leica SP5	Leica, Wetzlar
GS-800™ Calibrated Imaging Densitometer	BioRad, München
Heraeus CO ₂ -Inkubator Cytoperm 2	Kendro, Hanau
Kryokonserviergerät Mr Frosty	Nalgene
Leica SP5 konfokales Mikroskop	Leica Microsystems
Mikrotiterplatten-Reader Sunrise™	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikrovolumenspektralphotometer NanoDrop™ 1000	Peqlab, Erlangen
Neubauer Zählkammer, improved	Paul Marienfeld, Lauda
PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter	Peqlab, Erlangen

Nicht in der Tab. 2.1 aufgeführte Geräte sind Standardlaborgeräte.

Tab. 2.2: Auflistung verwendeter allgemeiner Laborchemikalien.

<u>Verwendete allgemeine Laborchemikalien</u>	<u>Firma</u>
Acrylamid-Bisacrylamid Lösung 40% (29:1)	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BD FACS Clean BD	BD Bioscience (Heidelberg)
BD FACS Flow BD	BD Bioscience (Heidelberg)
BD FACS Shutdownsolution	BD Bioscience (Heidelberg)
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
BSA	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Mowiol	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Nukleasefreies Wasser	Promega,
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Primer	Thermo Fisher
Propanol	Carl Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Biomol, Hamburg
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Tween20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

In der Tab. 2.2 nicht aufgeführten Materialien wurden im Reinheitsgrad *pro analysis* bezogen.

Tab. 2.3: Auflistung der verwendeten Mausstämme.

<u>Verwendete Mausstämme</u>	<u>Referenz</u>
LysMCre	Clausen et al, 1999
Rac1 ^{fl/fl} , LysM::Cre/LysM::Cre	Dissertation, Stefan Wölke, MvPI (Wölke, 2011)
RhoA ^{fl/f} , LysM::Cre/LysM::Cre	Dissertation, Stefan Wölke, MvPI (Wölke, 2011)
Rac1 ^{fl/fl} /RhoA ^{fl/fl} , LysM::Cre/LysM::Cre	MvPI
Cdc42 ^{fl/fl} , LysM::Cre/LysM::Cre	Dissertation, Stefan Wölke, MvPI (Wölke, 2011)
lys-EGFP-ki (hier LysM-eGFP)	Faust et al, 2000

Tab. 2.4 Auflistung des verwendeten Zellkulturplastiks.

<u>Verwendetes Zellkulturplastik</u>	<u>Hersteller</u>
Petrischalen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
6-well Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
12-well Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
24-well Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
96-well Rundbodenplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz
96-well Flachbodenplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
Filterflaschen	TPP, Trasadingen, Schweiz

Tab. 2.5: Auflistung der verwendeten Zytokine und Chemikalien für die Differenzierung und Immortalisierung von Knochenmarkzellen.

<u>Verwendetes Zytokine für Differenzierung</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Hersteller</u>
rekombinantes murines M-CSF	10 ng/ml	PeproTech, Hamburg
rekombinantes murines GM-CSF	20 ng/ml	PeproTech, Hamburg
<u>Verwendetes Zytokine für Immortalisierung</u>		
rekombinantes murines IL-3	10 ng/ml	PeproTech, Hamburg
rekombinantes murines IL-6	20 ng/ml	PeproTech, Hamburg
rekombinantes murines SCF	1% (\cong 25ng/ml)	Hergestellt in CHO-Expressionszelllinie von Dr. S. Wölke
Ficoll-Paque PLUS	-	GE Healthcare

Tab. 2.6: Auflistung verwendeter Puffer und Medien für die Zellkultur.

<u>Verwendete Puffer und Medien für Zellkultur</u>	<u>Firma</u>
DMEM (4500mg/l Glucose)	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI	Invitrogen, Karlsruhe
Opti-Mem	Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe
Pferdeserum	Invitrogen, Karlsruhe
Glutamin (final 2mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Pyruvat (final 1mM)	Invitrogen, Karlsruhe
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
DPBS, ohne CaCl ₂ , ohne MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe
β-Östradiol	Sigma, Taufkirchen

Tab. 2.7: Auflistung der verwendeten TLR Agonisten.

<u>Verwendete TLR Agonisten</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Firma</u>
Pam3CSK4	1µg/ml	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Ultra pure LPS (<i>Salmonella</i>)	100-500ng/ml	Invivogen, Toulouse, Frankreich
CpG 1668 (Type B CpG)	0,7µM	Invivogen, Toulouse, Frankreich

Tab. 2.8: Auflistung der verwendeten Antikörper und Reagenzien für die FACS-Färbung.

<u>Verwendete FACS Antikörper</u>	<u>Konjugat</u>	<u>Eingesetzte Antikörpermenge / 10⁵ Zellen</u>	<u>Spezies</u>	<u>Hersteller</u>
Oberflächenfärbung				
F4/80 Klon BM8	PE-Cy5	0,2 µg	Ratte IgG2a, κ	ebioscience, Frankfurt
CD11b Klon M1/70	PE-Cy7	0,125 µg	Ratte IgG2b, κ	ebioscience, Frankfurt
CD11c Klon N418	PerCP-Cy5.5	0,25 µg	Armenischer Hamster IgG	ebioscience, Frankfurt
Ly6G Klon 1A8	PE	0,2 µg	Ratte IgG2a, κ	BD, Heidelberg
MHC-I	FITC	1 µl		Immunotech
MHC-II Klon M5/114.15.2	PE	0,2 µg	Ratte IgG2b, κ	ebioscience, Frankfurt
CD80 Klon 16-10A1	APC	0,1 µg	Armenischer Hamster IgG	ebioscience, Frankfurt
CD86 Klon GL1	FITC	0,125 µg	Ratte IgG2a, κ	Pharmingen
TLR2 Klon 6C2	FITC	1 µg	Ratte IgG2b, κ	ebioscience, Frankfurt
TLR4 Klon UT41	PE	0,5 µg	Maus IgG1	ebioscience, Frankfurt
CD14 Klon Sa2-8	FITC	1 µg	Ratte IgG2a, κ	ebioscience, Frankfurt

<u>Verwendete FACS Antikörper</u>	<u>Konjugat</u>	<u>Eingesetzte Antikörpermenge / 10⁵ Zellen</u>	<u>Spezies</u>	<u>Hersteller</u>
Blockierungsantikörper für FACS Färbung				
α-mouse CD16/32 (Fc-Block) Klon 93	-	0,5 µg	Ratte IgG2a, λ	Ebioscience, Frankfurt
Polystyrenkugeln für Fluoreszenzkomensierung				
CompBeads	-	-	Anti-Ratte and Anti-Hamster Ig, κ	BD, Heidelberg
CompBeads	-	-	Anti-Maus Ig, κ (negative Kontrolle)	BD, Heidelberg

Tab. 2.9: Auflistung der verwendeten Inhibitoren für die Zellkultur.

<u>Verwendete Inhibitoren</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Firma</u>
NSC 23766 Rac1-Inhibitor	50-200 µM	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Y-27632 ROCK-Inhibitor	10-40 µM	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Wortmannin	1 µM	Sigma-Aldrich

Tab. 2.10: Auflistung der verwendeten Antikörper und Reagenzien für die Immunfluoreszenz.

<u>Antikörper und Reagenzien Immunfluoreszenz</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller/</u>
anti-Aktin (I-19) erkennt C-Terminus von Aktin	Kaninchen	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Kaninchen Alexa-Fluor-555	Ziege	1:250	Invitrogen, Karlsruhe
DAPI	-	1:3000 (3 mg/ml Stock)	Sigma Aldrich

Tab. 2.11: Auflistung der verwendeten ELISA Reagenzien.

<u>Verwendete ELISA Reagenzien</u>	<u>Firma</u>
murines IL-12 ELISA Development Kit	PeproTech, Hamburg
murines IL-10 ELISA Development Kit	PeproTech, Hamburg
murines IL-6 ELISA Development Kit	PeproTech, Hamburg
murines TNF α ELISA Development Kit	PeproTech, Hamburg
Streptavidin HRP (Verdünnung 1:2000)	BD, Heidelberg
OptEIA	BD, Heidelberg

Tab. 2.12: Auflistung des verwendeten Plastikmaterials für ELISA.

<u>Verwendete Plastikmaterialien für ELISA</u>	<u>Firma</u>
96-well immunograde Flachbodenplatten	Brand, Wertheim

Tab. 2.13: Auflistung der verwendeten Antikörper für Proteindetektion mittels Western Blot.

<u>Verwendete Antikörper für Western Blot</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Firma</u>
anti-Rac1 (23A8)	Maus	1:2000	Millipore, Merck, Darmstadt
anti-RhoA (67B9)	Kaninchen	1:1500	Cell Signaling, NEB, Frankfurt
anti-Cdc42 (11A11)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, NEB, Frankfurt
anti-GAPDH (14C10)	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling, NEB, Frankfurt
anti-TLR4 (25)	Maus	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Tab. 2.14: Auflistung der verwendeten Antikörper zum Nachweis der Phosphorylierung mittels Western Blot.

<u>Verwendete Antikörper zum Nachweis der Phosphorylierung</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Firma</u>
anti-Phospho-NF-kB p65 (Ser536) (93H1)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, NEB, Frankfurt
anti-Phospho-Akt (Ser473)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, NEB, Frankfurt
anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Maus	1:1000	Cell Signaling, NEB, Frankfurt
anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, NEB, Frankfurt
anti-Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (98F2)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, NEB, Frankfurt
anti-Phospho-GSK-3 β (Ser9) (D85E12)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, NEB, Frankfurt

Tab. 2.15: Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper zum Nachweis von Proteinen mittels Western Blot.

<u>Verwendete sekundäre Antikörper für WB</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Firma</u>
anti-Maus HRP	Ziege	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Kaninchen HRP	Ziege	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Tab. 2.16: Auflistung der verwendeten Reagenzien für Western Blot.

<u>Verwendete Detektionslösungen für WB (HRP Substrat)</u>	<u>Firma</u>
Immobilon Western	Millipore, Merck, Darmstadt
ECL Western Blotting Detection	GE Healthcare, München

Tab. 2.17: Auflistung der verwendeten Primer für die Echtzeit-PCR-Quantifizierung.

<u>Verwendete Primer für qRT-PCR</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Konzentration</u>
IL-12 left	CGC AGC AAA GCA AGG TAA GT	0,4 µM
IL-12 right	CCTCTAGATGCAGGGAGTTAGC	0,4 µM
IL-10 left	CAGAGCCACATGCTCCTAGA	0,4 µM
IL-10 right	GTCCAGCTGGTCCTTTGTTT	0,4 µM
HPRT left	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	0,4 µM
HPRT right	CCTGGTTCATCATCGCTAATC	0,4 µM

Tab. 2.18: Auflistung der verwendeten Sonden für die Echtzeit-PCR-Quantifizierung.

<u>Verwendete Sonden für qRT-PCR</u>	<u>Roche Probe Library</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Hersteller</u>
Sonde IL-12	# 103	0,1 µM	Roche, Penzberg, Deutschland
Sonde IL-10	# 41	0,1 µM	Roche, Penzberg, Deutschland
Sonde HPRT	# 95	0,1 µM	Roche, Penzberg, Deutschland

Tab. 2.19: Auflistung der verwendeten Reagenzien und Kits für die Echtzeit-PCR-Quantifizierung.

<u>Verwendete Reagenzien und Kits für qRT-PCR</u>	<u>Firma</u>
TRIZOL®	Invitrogen, Karlsruhe
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Maxima® Probe qPCR Master Mix (2x), ROX solution provided	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Tab. 2.20: Auflistung des verwendeten Plastiks für die Echtzeit-PCR-Quantifizierung.

<u>Verwendete Plastikmaterialien für qRT-PCR</u>	<u>Firma</u>
Micro Amp optical 96-well Reaction Plate with Barcode	applied Biosystems, life technologies, Darmstadt
Micro Amp Optical Adhesive Film	applied Biosystems, life technologies, Darmstadt

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimentelle Arbeiten

2.2.1.1 Isolierung muriner Knochenmarkzellen (KMZ)

Die für diese Arbeit verwendeten Mäuse wurden gemäß §4 Tierschutzgesetz durch das Einströmen von CO₂ in die Tötungskammer getötet. Anschließend wurden *Femur* und *Tibia* freipräpariert, in Ethanol desinfiziert und in PBS (DPBS, Invitrogen, Karlsruhe) überführt. Die Epiphysen wurden mit einem sterilen Skalpel abgetrennt und das Knochenmark mit Hilfe einer sterilen 0,45 mm Kanüle und Spritze mit kaltem PBS heraus gespült. Die gewonnenen KMZ (Knochenmarkzellen) wurden zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen, die KMZ in 5 ml PBS resuspendiert und ausgezählt (Protokoll in Anlehnung an Zhang *et al.*, 2008).

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden 10 µl einer Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert, die Zellen in 4 Großquadraten ausgezählt und mittels angegebener Formel die Anzahl der Zellen pro ml Zellsuspension berechnet.

$$\sum \text{Zellzahl der 4 Großquadrate} / 4 \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellen} / \text{ml Zellsuspension}$$

2.2.2.2 Differenzieren der Knochenmarkzellen mittels M-CSF

Pro Petrischale wurden 2x10⁶ KMZ in 8 ml kaltem M-CSF enthaltendem Medium ausgesät. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte inkubiert. Am 3. Tag und am 7. Tag wurden jeweils 4 ml frisches Medium (4°C) zu dem Zellmedium dazugegeben, ohne Medium zu entfernen. Von Tag 10 – Tag 12 konnten die Zellen für Experimente genutzt werden. Die Differenzierung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll beschrieben von Zhang *et al.*, 2008. Zellen, die für Experimente mit M-CSF differenziert wurden, werden im Folgenden als M-MΦ bezeichnet.

M-CSF enthaltendes Medium: DMEM (4500 mg/l Glucose) (Invitrogen, Karlsruhe)
10% Fötale Kälberserum (Invitrogen, Karlsruhe)
5% Pferdeserum (Invitrogen, Karlsruhe)
2 mM Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe)
1 mM Pyruvat (Invitrogen, Karlsruhe)
10 mM HEPES (Invitrogen, Karlsruhe)
10 ng/ml rekombinantes murines M-CSF (Peprotech, Hamburg)
steril filtriert

2.2.2.3 Differenzieren der Knochenmarkzellen mittels GM-CSF

Pro Petrischalen wurden 2×10^6 KMZ in kaltem 8 ml GM-CSF enthaltendem Medium ausgesät. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte bebrütet. Am 3. Tag und am 6. Tag wurden jeweils 4 ml frisches Medium (4°C) in das Kulturmedium dazugegeben, ohne Medium zu entfernen. Von Tag 8 – Tag 10 wurden die Zellen für Experimente verwendet. Die Differenzierung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll beschrieben von Fleetwood *et al.*, 2009, wobei die adhären-ten Zellen für Versuche genutzt wurden. Zellen, die mit GM-CSF differenziert wurden, werden im Folgenden als GM-MΦ bezeichnet.

GM-CSF enthaltendes Medium: RPMI (Invitrogen, Karlsruhe)
10% FKS (Invitrogen, Karlsruhe)
2 mM Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe)
1 mM Pyruvat (Invitrogen, Karlsruhe)
20 ng/ml rekombinantes murines GM-CSF (Peprotech, Hamburg)
steril filtriert

2.2.2.4 Ernten von M-CSF-stimulierten Knochenmarkmakrophagen

Zum Ernten der M-MΦ wurden die Zellen für 15-30 min bei 4°C inkubiert, was die Adhärenz der Zellen von der Plastikoberfläche vermindert. Zum vollständigen Ablösen wurden die M-MΦ mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgeschabt und zum Zentrifugieren in ein Falcon überführt. Die M-MΦ wurden mit 300 x g für 10 min und 4°C pelletiert, in neuem Medium resuspendiert, ausgezählt und für Versuche in die jeweiligen Reaktionsgefäße ausgesät.

2.2.2.5 Ernten von GM-CSF-stimulierten Knochenmarkmakrophagen

Zum Ernten der GM-M Φ wurden die Suspensionszellen abgenommen und auf die verbleibenden adhärennten GM-M Φ PBS gegeben. Die Zellen wurden für 15-30 min bei 4°C inkubiert, um die Adhärenz an der Plastikoberfläche zu vermindern. Anschließend erfolgte das Ablösen der GM-M Φ mit Hilfe eines Zellschabers. Zum Zentrifugieren wurden die Zellen in ein Falcon überführt und mit 300 x g für 10 min und 4°C zentrifugiert. Nach Zugabe von frischem Medium wurden die GM-M Φ resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend erfolgte die Aussaat in die jeweiligen Reaktionsgefäße.

2.2.2.6 Stimulierung von Zellen zur Messung der Zytokinmenge im Zellkulturüberstand

Um die Zytokine im Zellkulturüberstand zu bestimmen, wurden zunächst 3×10^5 M-M Φ oder 2×10^5 GM-M Φ in 600 μ l pro Kavität einer Platte mit 12 Kavitäten (12-well Platte) gesät. Für die Stimulierung mit TLR-Agonisten wurde am folgenden Tag das Medium abgenommen und die M Φ anschließend mit 300 μ l Medium ohne M-CSF oder GM-CSF mit den jeweiligen Agonisten für 6 h oder 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Zellkulturüberstand gesammelt und bei -20°C bis zur Messung der Zytokinmenge mittels ELISA gelagert.

2.2.2.7 Vorinkubation der M Φ mit Inhibitoren

$1,5 \times 10^5$ M-M Φ oder 1×10^5 GM-M Φ wurden in je eine Kavität einer 24-well Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurde zur Hemmung von Rac1, ROCK oder der PI3-Kinase der Rac1-Inhibitor NSC23766 (50-200 μ M), der ROCK-Inhibitor Y-27632 (10-40 μ M) und Wortmannin (1 μ M) verwendet. Die Hemmung von Rac1 und ROCK erfolgte durch eine 4 stündige Vorinkubation, die Hemmung der PI3-Kinase durch die Vorinkubation mit Wortmannin für 1 h. Anschließend erfolgte die Inkubation mit TLR-Agonisten in Anwesenheit des jeweiligen Inhibitors für 24 h oder 6 h wie unter 2.2.6 beschrieben.

2.2.2.8 Stimulierung von Zellen zur Bestimmung der Zytokin-mRNA

Für die Bestimmung des mRNA-Levels wurden 3×10^5 M-M Φ oder 2×10^5 GM-M Φ in 600 μ l Medium pro Kavität einer 12-well Platte ausgesät und am folgenden Tag mit TLR-Agonisten (300 μ l) für 3 h oder 6 h stimuliert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen durch Zugabe von 500 μ l TRIzol (Invitrogen) lysiert. Bis zur Isolierung der RNA erfolgte die Lagerung bei -20°C nach Herstellerangaben (Invitrogen).

2.2.3 Immunologische Methoden

2.2.3.1 Bestimmung der Zytokinmenge in Zellkulturüberstand mittels Sandwich-ELISA

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde 1971 von Engvall und Perlmann beschrieben und ist ein Immunassayverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Hierbei werden zwei Antikörper verwendet. Der erste Antikörper (auch *capture antibody*) wird über Nacht an eine feste Phase (96-well Mikrotiterplatte) gebunden. Am folgenden Tag werden zunächst unspezifische Bindungen an der Oberfläche der festen Phase abgesättigt, anschließend erfolgt die Inkubation mit der Probe, wobei es zur Bindung des Antigens an den Antikörper kommt. Nicht gebundenes Protein wurde abgewaschen und der Komplex mit einem zweiten Antikörper (*detection antibody*), der mit einem anderen Epitop, an das Antigen bindet, inkubiert. Der zweite Antikörper ist biotinyliert. Die Bindung von Streptavidin-HRP-Konjugat an den zweiten Antikörper führt zu einer Signalverstärkung. Die Detektion erfolgte durch Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB) und H_2O_2 , wodurch es zu einem Farbumschlag kommt. Diese Reaktion kann durch Zugabe von H_2SO_4 abgestoppt werden.

Die Durchführung des Sandwich ELISA erfolgte mit ELISA Development Kits der Firma PeproTech (Hamburg, Deutschland) nach Herstellerangaben mit der Hälfte der im Kit angegebenen Antikörpermenge. Um ein Abstoppen der Reaktion zu ermöglichen, wurde das Avidin-HRP-Konjugat durch Streptavidin-HRP-Konjugat (Firma BD) ersetzt und damit die Detektion mit Tetramethylbenzidin (TMB) und H_2O_2 (OptEIA, Firma BD) ermöglicht. Das Messen des Farbumschlags erfolgte im Tecan ELISA-Reader mit dem Programm Magelan, die anschließende Auswertung mittels GraphPad Prism 5.0. Dabei werden die gemessenen Werte des eingesetzten Standards für jeden ELISA genutzt, um eine nicht-lineare Regressionskurve zu erstellen, durch die es möglich ist, die gemessenen Werte der Proben zu interpolieren, um die zugehörigen Konzentrationen zu bestimmen.

2.2.3.2 Anfärbung des Aktinzytoskeletts durch Immunfluoreszenz

Um das Zytoskelett der M-M Φ und der GM-M Φ anzufärben, wurden die Zellen am Vortag in M-CSF- oder GM-CSF-haltigem Medium auf Deckgläschen ausgesät und am nächsten Tag mit 100 ng/ml LPS oder in Medium ohne Agonist stimuliert. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit 3% PFA in PBS für 20 min bei RT fixiert und erneut 3x mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der M Φ erfolgte durch Inkubation mit eiskaltem Methanol für 10 min, anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS (RT) gewaschen. Für die Färbung wurden zunächst unspezifische Bindestellen für 1 h mit 10% Pferdeserum blockiert. Für eine weitere Stunde wurden die Deckgläschen mit dem Primärantikörper in 10% Pferdeserum inkubiert, danach 3x mit PBS gewaschen. Danach folgte für eine Stunde die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in 10% Pferdeserum zusammen mit Dapi, um gleichzeitig die DNA anzufärben. Die Präparate wurden 3x mit PBS gewaschen und mit einem Tropfen Mowiol eingedeckelt, mit Nagellack versiegelt und dunkel bei 4°C gelagert. Die Visualisierung der Präparate wurde mit dem Leica SP5 Mikroskop (Leica, Deutschland) und einem 63x Öl Immersionsobjektiv durchgeführt. Zur Bearbeitung der Bilder wurde die LAS AF Software (Leica, Deutschland) verwendet.

2.2.3.3 Nachweis von KMZ-spezifischen Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie

Die Technologie der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie wurde bereits 1968 entwickelt (Patent DE1815352). Bei dieser Methode können Aussagen über Einzelzellen anhand ihrer Form, Struktur und nach Beladung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern über Färbung getroffen werden. Für die Färbung von Antigenen auf der Oberfläche der Zellen wurden ausgesäte, bei 37°C inkubierte und stimulierte bzw. nicht stimulierte Zellen zunächst bei 4°C inkubiert, um das Ablösen von der Plastikoberfläche zu erleichtern, anschließend mit einem Zellschaber von der Oberfläche der Kulturschale geschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (300 x g, 5 min, 4°C) und in FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden ausgezählt und $1-5 \times 10^5$ Zellen in 100 μ l FACS-Puffer pro Kavität einer 96-well Rundbodenplatte ausgesät. Die anschließende Färbung erfolgte auf Eis. Da sich auf den Makrophagen Fc-Rezeptoren befinden, die unspezifisch Antikörper binden können, wurden zunächst unspezifische Bindungen durch Inkubation mit Fc-Block für 15 min gesättigt. Anschließend erfolgte die Zugabe der mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Antikörper für 30 min danach wurden die Zellen 2x mit FACS-Puffer gewaschen. Hierzu wurden die Zellen mit 300 x g, für 5 min, bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden entweder sofort auf die Expression der Oberflächenmarker hin untersucht oder mit 3% PFA für 20 min fixiert, erneut 2 mal mit FACS-Puffer gewaschen und bei 4°C bis zur FACS-Analyse

Material und Methoden

Probenpuffer:	200 mM Tris-HCl pH 6,8 4% SDS 20% Glycerin 200 mM DTT (Dithiothreitol) Bromphenolblau	
Polyacrylamidgel:	<u>12% Trenngel</u> 2,5 ml Tris-HCl pH 8,8 100 µl 10% SDS 50 µl 10% APS 10 µl TEMED 2,5 ml Polyacrylamid (40%) H ₂ O ad 10 ml	<u>4% Sammelgel</u> 1,25 ml Tris-HCl pH 6,8 50 µl 10% SDS 25 µl 10% APS 10 µl TEMED 0,5 ml Polyacrylamid (40%) H ₂ O ad 5 ml
Laufpuffer (10x):	30 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS H ₂ O ad 1 l	
Blotpuffer (10x):	5,82 g Tris 2,93 g Glycin 200 ml Methanol H ₂ O ad 1 l	
PBS (10x):	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g NaH ₂ PO ₄ H ₂ O ad 1 l pH 7,4	

2.2.3.4.2 Nachweis der Proteinphosphorylierung

Zur Herstellung der Proteinproben zum Nachweis der Phosphorylierung wurden $1,5 \times 10^5$ M-M Φ pro Vertiefung einer 24-well Platte ausgesät und bei 37°C 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in je zwei Kavitäten mit den jeweiligen Agonisten stimuliert oder unstimuliert gelassen. Nach 0 min, 10 min, 20 min oder 30 min wurden die Zellen auf Eis gestellt, der Überstand abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 20 μ l Probenpuffer/Kavität lysiert. Gleiche Proben wurden in ein Eppendorfgefäß überführt, 5 min bei 95°C erhitzt und zentrifugiert. Bis zur Beladung des Gels wurden die Gesamtzelllysate bei -20°C gelagert. 4,5 μ l Probe wurde pro Spur eines SDS Gels aufgetragen, geblottet und mit spezifischen Antikörpern zur Bestimmung der Phosphorylierung sowie des Haushaltsgens GAPDH inkubiert, wie oben (2.2.3.4.1) beschrieben.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Echtzeit-PCR-Quantifizierung (quantitative Real-Time PCR, ratiometrische Zytokintranskriptbestimmung)

Aus den TRIzol-Proben wurde nach Angaben der Firma Invitrogen durch Zugabe von Chloroform, Isopropanol und Ethanol die RNA isoliert. Gereinigte RNA wurde bei -20°C gelagert. 200 ng RNA wurden mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Fermentas nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben und bei -20°C aufbewahrt. Für die folgende Echtzeit-PCR-Quantifizierung wurde das „Maxima™ Probe qPCR Master Mix (2X), with ROX“ Kit der Firma Fermentas verwendet. Die für den Nachweis der mRNA spezifischen Sonden und Primer wurden mit Hilfe des „Assay Design Center“ auf der Internetseite www.universalprobelibrary.com bestimmt. Die Polymerasekettenreaktion erfolgte im AbiPrism 7000 als absolute Quantifizierung mit folgenden Parametern:

1. 94°C 12 min
2. 95°C 20 s
3. 60°C 1 min

Dabei war der erste Schritt die initiale Denaturierung der DNA. Die Amplifizierung der DNA (Schritte 2 und 3) (Anlagerung der Primer und Elongation) erfolgte in 45 Zyklen. Die Auswertung erfolgte durch die Bestimmung der C_t-Werte jeder Reaktion und dem Vergleich der C_t-Werte des zu untersuchenden Gens mit dem Haushaltsgen. Unter der Annahme, dass sich die Transkript-

menge mit jedem Zyklus verdoppelt, wurde zur Berechnung des Verhältnisses von Zytokintranskripten zu Transkripten des Haushaltsgens HPRT die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode angewandt. Hierbei erfolgten 2 Normierungen.

- 1) Die Normierung der Ct-Werte auf das Haushaltsgen jeder einzelnen Reaktion ($\Delta C_t = C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{Haushaltsgen})$).
- 2) Die Normierung von ΔC_t auf die unbehandelte Kontrolle der Kontrollzellen ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Knockout}) - \Delta C_t(\text{wt-Cre})$).

Die Berechnung von $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ergibt das Verhältnis von mRNA Level der Zytokine zu mRNA Level von HPRT (Zhang *et al.*, 2012).

2.2.5 Immortalisieren von Knochenmarkzellen

Die hier beschriebene Methode erfolgte nach dem Protokoll von Wang *et al.*, 2006 und beruht darauf, dass KMZ durch retrovirale Infektion so genetisch verändert werden, dass sie sich während der Inkubation in Östrogen-haltigem Medium nicht weiter differenzieren, aber proliferieren und damit immortalisiert werden (Wang *et al.*, 2006).

2.2.5.1 Isolierung von Knochenmarkzellen und Erythrozytenlyse

KMZ wurden wie unter 2.1.1 angegeben isoliert. Anschließend erfolgte die Erythrozytenlyse durch Inkubation mit ACT-Puffer für 5 min. Zur Neutralisierung und zum Stoppen der Lyse wurde 10% FKS in Opti-Mem (Invitrogen) zugegeben und die Zellen pelletiert (300 x g, 4°C für 5 min). Die Lyse wurde wiederholt und das Pellet zum Schluss in 4 ml 10% FKS in PBS resuspendiert.

ACT-Puffer	15 M Ammoniumchlorid
	0,017 M Tris
	pH 7,4

2.2.5.2 Trennung reifer Granulozyten von Knochenmarkzellen

Von den in 4 ml aufgenommenen KMZ wurden anschließend die reifen Granulozyten getrennt. Dies geschah durch Pipettieren der KMZ auf 3 ml Ficoll und anschließender Zentrifugation bei 450 x g und 4°C für 30 min. Nach der Zentrifugation wurden 6,5 ml abgenommen, in ein 50 ml Falcon überführt und mit 10% FKS in PBS aufgefüllt. Die Zellen wurden mit 300 x g bei 4°C für

10 min zentrifugiert und mit 5 ml 10% FKS in PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und das Pellet in 2 ml Stammzellmedium resuspendiert (nach Wang *et al.*, 2006).

Stammzellmedium: Optimem (Invitrogen, Karlsruhe)
 15% FKS
 10 ng/ml IL-3
 20 ng/ml IL-6
 1% SCF (\cong 25 ng/ml)

2.2.5.3 Vermehrung der Zellen durch Inkubation mit IL-3, IL-6 und SCF

Da Retroviren in der Regel proliferierende Zellen effizienter infizieren, wurden je 5×10^5 Zellen in 2 Kavitäten einer 12-well-Platte ausgesät und 2 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI supplementiert mit IL-3, IL-6 und SCF inkubiert (Stammzellmedium, s. S. 49). Durch diese Vorkultivierung kommt es zur Expansion der gereinigten unreifen KMZ (nach Wang *et al.*, 2006).

2.2.5.4 Virusinfektion durch Spininfektion

Nach der Expansion der Zellen für 2 Tage wurden 1×10^5 Zellen in 250 μ l SCF-Medium zur Generierung von immortalisierten neutrophilen Granulozyten oder in GM-CSF Medium zur Herstellung immortalisierter M Φ pro well einer 12-well-Platte ausgesät. Dabei wurde ein well für die Virusinfektion verwendet, im zweiten waren KMZ, die nicht infiziert wurden und somit Kontrollzellen darstellten, da diese im Gegensatz zu den immortalisierten Zellen nach einer bestimmten Zeit absterben sollen (nach Wang *et al.*, 2006).

SCF-Medium: Opti-Mem
 10% FKS
 1% SCF
 1 μ M β -Östradiol

GM-CSF-Medium: Opti-Mem
 10% FKS
 1% SCF
 1 μ M β -Östradiol
 10 ng/ml GM-CSF

Zu den KMZ, die immortalisiert werden sollten, wurden 750 µl Virusüberstand (hergestellt von Dr. S. Wölke) mit 5 µg/ml Polybrene (Millipore) gegeben, zu den Kontrollzellen Medium ohne Virusüberstand. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (300 x g, 30°C, 90 min). Während der Zentrifugation erfolgt die retrovirale Infektion.

Bei den KMZ, die zu immortalisierten MΦ werden sollten, wurde das SCF-Medium gegen GM-CSF Wachstumsmedium ausgetauscht. Zu den Zellen, die sich zu Granulozyten differenzieren sollen, wurde 1 ml Opti-Mem (10% FKS) zugegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen gesplittet und an den folgenden Tagen das Wachstum beobachtet und bei Bedarf gesplittet.

GM-CSF Wachstumsmedium: RPMI

10% FKS

1 µM β-Östradiol

10 ng/ml GM-CSF

2.2.5.4.1 Herstellen von Virusüberstand (durchgeführt von S. Wölke)

Für die Herstellung von Retroviren wurden Phoenix-eco-Verpackungszellen verwendet und mit dem Expressionsvektor (enthält das Gen für das Fusionsprotein Östrogenrezeptor-HoxB8) und dem Verpackungsvektor (enthält virale Hüllproteine) transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit dem Fugene HD Transfektionsreagenz (Roche) nach Herstellerangaben. Am nächsten Tag wurde das Medium durch Opti-Mem, 10% FKS ausgetauscht. An den Tagen 3 und 4 wurde der Virusüberstand gesammelt. Dazu wurde der Zellkulturüberstand (enthält Retroviren) in ein 15 ml Falcon überführt, zunächst zentrifugiert (1800 x g, 5 min, RT) und mit einem 0,45 µm Filter filtriert. Aliquotierter Virusüberstand wurde bei -80°C gelagert (nach Wang *et al.*, 2006).

2.2.5.5 Kryokonservieren von immortalisierten Zellen

Vier Wochen nach der retroviralen Infektion wurden die Zellen eingefroren. Nicht ausdifferenzierte immortalisierte Zellen sind Suspensionszellen. Zum Einfrieren wurden die Zellen einer Vertiefung einer 12-well Platte zentrifugiert (300 x g, 10 min, RT) und in 500 µl Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen überführt und mit dem Kryoeinfriergerät *Mr Frosty* (Nalgene), das ein langsames schrittweises Abkühlen von 1°C pro min ermöglicht, bei -80°C gelagert.

Einfrriermedium: FKS
10% DMSO
1:25 SCF
oder 1:25 SCF, 10 ng/ml GM-CSF

2.2.5.6 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde zu 500 µl gefrorenen Zellen 1ml vorgewärmtes Medium (10% FKS in Opti-Mem) gegeben und vorsichtig resuspendiert, bis die Zellen aufgetaut waren. Anschließend wurden die Zellen in 9 ml Medium gegeben und zentrifugiert (300 x g, RT für 5 min). Das Pellet wurde in 2 ml SCF-Medium bzw. in 2 ml GM-CSF Wachstumsmedium für die Differenzierung zu Makrophagen resuspendiert und in eine Kavität einer 12-well Platte ausgesät.

2.2.5.7 Differenzierung der immortalisierten Zellen

Die aufgetauten Zellen wurden inkubiert, bis sie einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten (ca. 3 Tage). Anschließend wurden die Suspensionszellen abgenommen und pelletiert (300 x g, 10 min, RT) und mindestens 5x mit PBS gewaschen, um restliches β -Östrogen aus dem Medium zu entfernen. Die Zellen wurden in PBS resuspendiert und 1×10^6 Zellen pro Petrischale in GM-CSF-enthaltenden Medium ausgesät. Die Differenzierung und Zugabe von frischem Medium erfolgte wie bei der Differenzierung von primären Zellen angegeben für 10-15 Tage (s. 2.2.2.2 und 2.2.2.3) (in Anlehnung an Wang *et al.*, 2006 und Rosas *et al.*, 2011).

2.2.6 Statistik

Die Darstellung der Messergebnisse ist, wenn nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Die Überprüfung der statistischen Signifikanz der Ergebnisse erfolgte mittels Student t-Test, wobei ein p-Wert $<0,05$ als statistisch signifikant angegeben wurde.

3. Ergebnisse

Für die Untersuchung zur Rolle der Rho GTPasen in TLR-Signalwegen sollten primäre Makrophagen verwendet werden, die aus Knochenmarkzellen (KMZ) von unterschiedlichen LysMCre GTPase^{fl/fl}- Mäusen differenziert wurden. In der Literatur sind zwei Makrophagentypen beschrieben, die auf verschiedene Weise differenziert werden können: I. durch Inkubation mit M-CSF (*Macrophage Colony Stimulatory Factor*) entsteht der hier als M-MΦ bezeichnete Typ; II. durch Zugabe von GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulatory Factor*) entsteht der hier als GM-MΦ bezeichnete Typ. Dabei wird durch den Nachsatz in Klammern genauer spezifiziert, ob es sich um die LysMCre-Kontrollmakrophagen, die im Folgenden als Wildtypmakrophagen MΦ (wt) bezeichnet werden, handelt oder um eine GTPase Gendeletion (GTPase^{-/-}).

3.1 Differenzierung von KMZ der LysM-eGFP Maus

Die Deletion der jeweiligen GTPase-Gene durch die Cre-Rekombinase findet in Zellen statt, in denen der LysM-Promotor aktiv ist. In der Literatur ist in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten eine Aktivität dieses Promotors beschrieben (Clarke and Gordon, 1998). Um zu prüfen, ob der LysM-Promotor sowohl in M-MΦ als auch in GM-MΦ aktiv ist, wurden KMZ aus der LysM-eGFP Reportermaus (KMZ(LysM-eGFP)) isoliert (Faust *et al.* 2000) und mit M-CSF (M-MΦ(LysM-eGFP)) oder GM-CSF (GM-MΦ(LysM-eGFP)) differenziert. Von den M-MΦ(LysM-eGFP) und GM-MΦ(LysM-eGFP) wurde sowohl die Expression von GFP, als Marker für den LysM-Promotor und damit indirekt für die Expression der Cre-Rekombinase bestimmt, als auch die Expression der typischen Oberflächenmarker für Makrophagen, CD11b(*high* (hi)) und F4/80, für DCs, CD11c sowie für neutrophile Granulozyten, Ly6G und CD11b(*intermediate* (int)) über den gesamten Differenzierungszeitraum untersucht.

3.1.1 Differenzierung von KMZ zu M-MΦ(LysM-eGFP)

Knochenmarkzellen bestehen zu etwa 40-50% aus neutrophilen Granulozyten, die auf ihrer Oberfläche die charakteristischen Marker Ly6G und CD11b(int) zeigen. Die restlichen Zellen sind Vorläuferzellen, aus denen weitere hämatopoetische Zellen und Erythrozyten gebildet werden. Da auch in neutrophilen Granulozyten der LysM-Promotor aktiv ist, kann bereits am Tag der Isolierung (Tag 0) der KMZ in etwa der Hälfte der Zellen mittels Durchflusszytometrie GFP detektiert werden. Weniger als 10% der isolierten KMZ sind F4/80-positiv (Makrophagenmarker) oder CD11c-positiv (DC-Marker).

Bereits nach einem Tag Inkubation in M-CSF haltigen Medium kommt es zur Erhöhung des Anteils GFP-positiver Zellen von 45% auf 75%. Es kommt ebenfalls zu einem Anstieg des Anteils der Ly6G-positiven und Cd11b(int)-positiven Zellen und zusätzlich zum Auftreten einer weiteren CD11b(hi)-Population.

Ab dem 2. Tag der Inkubation mit M-CSF nimmt die Ly6G-positive und Cd11b(int)-positive Population stetig ab. Gleichzeitig kommt es zum Anstieg der CD11b(hi)-Population.

Ab dem 3. Tag der Differenzierung ist ein Anstieg von F4/80 nachweisbar.

An Tag 5 erreicht der Anteil GFP-positiver Zellen bereits 95%. Nur noch 25% der Zellen sind CD11b(int)-, 70% CD11b(hi)- und 20% der Zellen sind F4/80-positiv.

Ab Tag 7 sind 95% der Zellen CD11b(hi)-positiv. Diese Zellen sind ebenfalls GFP-positiv. 75% der Zellen sind F4/80-positiv. Ly6G- und CD11b(int)-positive Zellen können nicht mehr nachgewiesen werden.

CD11c ist während der gesamten Differenzierung von M-M Φ (LysM-eGFP) schwach nachweisbar.

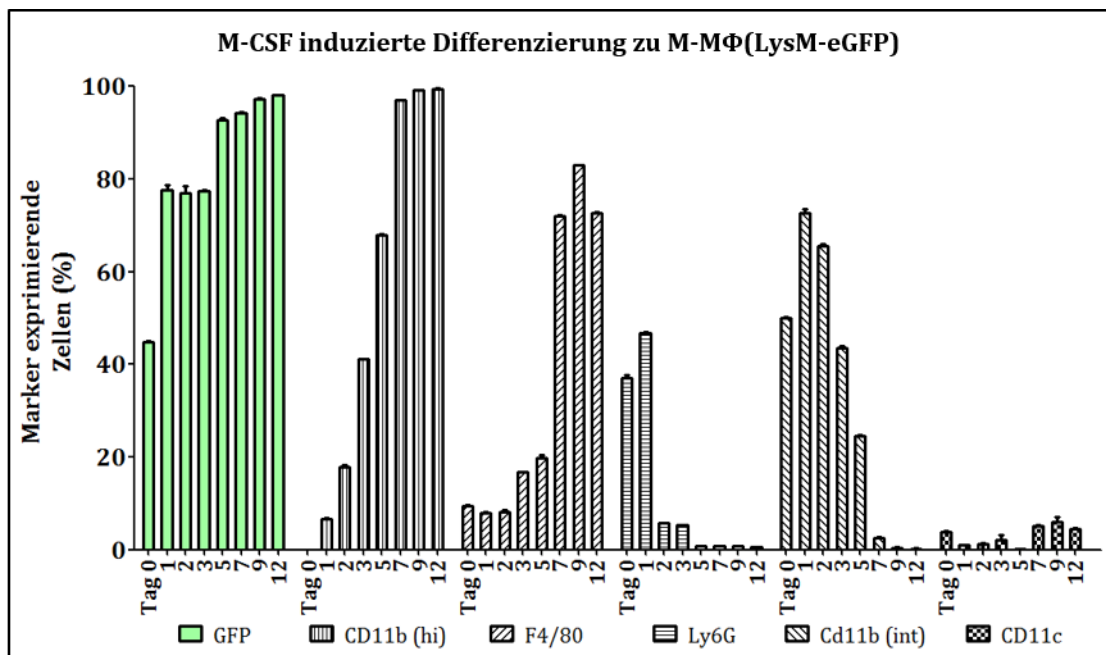


Abb.3.1: Kinetik der Differenzierung von KMZ(LysM-eGFP) zu M-M Φ (LysM-eGFP) in M-CSF haltigem Medium. Dargestellt ist die Veränderung der prozentualen Anteile von Zellen (Mittelwert von Duplika und Standardabweichung), die die jeweiligen Oberflächenmarker und GFP im Verlauf von 12 Tagen nach Inkubation in M-CSF-haltigem Medium exprimieren. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungen. Makrophagenmarker: CD11b(hi), F4/80, Neutrophilenmarker: CD11b(int), Ly6G, DC-Marker: CD11c.

3.1.2 Differenzierung von KMZ zu GM-M Φ (LysM-eGFP)

Auch in GM-CSF-haltigen Medium führt die Kultivierung von KMZ nach 12 Tagen zum überwiegenden Anteil (95%) von LysM-GFP-positiven und CD11b(hi)-positiven Zellen. Im Unterschied zur Kultivierung in M-CSF haltigem Medium steigt der Anteil von F4/80-positiven Zellen nur auf

35% und der von CD11c-positiven Zellen auf nahezu 100%. Der Neutrophilenmarker Ly6G wurde wie bei der Kultivierung in M-CSF-haltigem Medium nach 12 Tagen nicht mehr nachgewiesen.

An Tag 1 der Inkubation der KMZ in GM-CSF-haltigem Medium sieht man wie im M-CSF-haltigem Medium einen deutlichen Anstieg der GFP-exprimierenden Zellen auf ca. 70%. Es kommt ebenfalls zu einem Anstieg von Ly6G und CD11b(int), aber auch CD11b(hi), F4/80 und CD11c konnte nachgewiesen werden.

Bereits am 2. Tag ist der Anteil der CD11b(hi)-Population auf 40% gestiegen. Die Ly6G-positive und CD11b(int)-positive Population nimmt ab dem 2. Tag stetig ab, was auch bei Inkubation in M-CSF-haltigem Medium nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu nimmt der Anteil von F4/80-positiven und CD11c-positiven Zellen zu. An Tag 7 sind ca. 80% der Zellen GFP-positiv und CD11b(hi)-positiv. 30% der Zellen sind F4/80-positiv, wobei es sich um eine schwache Expression handelt. 95% der Zellen sind CD11c-positiv. Die Ly6G-positive und CD11b(int)-positive Population nimmt weiterhin ab. Bis zu Tag 12 konnte in nahezu 95% der adhärennten Zellen GFP detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt waren nahezu 100% der Zellen CD11c-positiv, mehr als 80% der Zellen waren CD11b(hi)- und etwa 35% F4/80-positiv. Ly6G konnte nicht mehr detektiert werden und nur auf 10% der Zellen war CD11b(int).

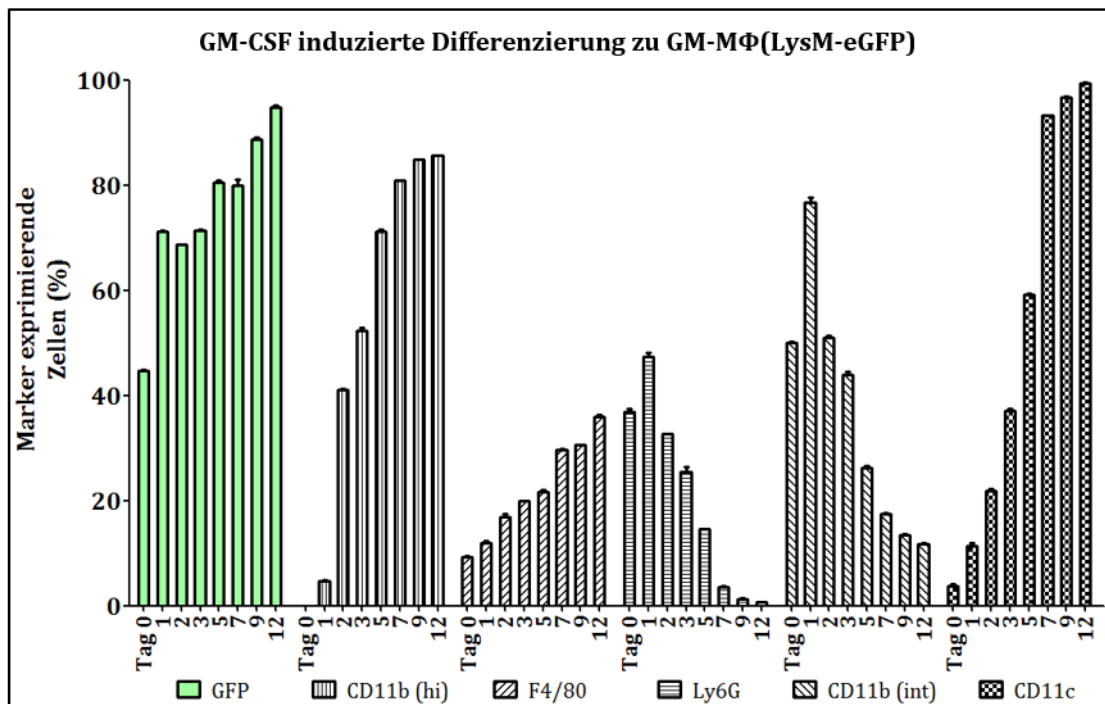


Abb.3.2: Kinetik der Differenzierung von KMZ(LysM-eGFP) zu GM-MΦ(LysM-eGFP) in GM-CSF haltigem Medium. Dargestellt ist die Veränderung der prozentualen Anteile von Zellen (Mittelwert von Duplika und Standardabweichung), die die jeweiligen Oberflächenmarker und GFP im Verlauf von 12 Tagen nach Inkubation in GM-CSF-haltigem Medium exprimieren. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungen. Makrophagenmarker: CD11b(hi), F4/80, Neutrophilenmarker: CD11b(int), Ly6G, DC-Marker: CD11c.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl in M-M Φ als auch in GM-M Φ der LysM-Promotor nach 12 Tagen Kultivierung aktiv ist. Fast alle M-M Φ und GM-M Φ zeigen die charakteristischen Oberflächenmarker für die jeweilige Zellpopulation und die Anzahl an Zellen mit Neutrophilenmarkerexpression sinkt rapide. Die Voraussetzungen für die Cre-vermittelte Deletion der „geflochten“ GTPasen sind erfüllt.

3.2 Nachweis der Depletion von GTPasen in M-M Φ und GM-M Φ aus konditionalen Rho GTPase-Knockout Mäusen

Wie unter 3.1 und 3.2 gezeigt, ist der LysM-Promotor sowohl in M-M Φ als auch in GM-M Φ aktiv. Mittels SDS-PAGE und anschließender Immunoblotanalyse von Gesamtzelllysaten konnte durch Färbung mit spezifischen Antikörpern gezeigt werden, dass sowohl in den M-M Φ als auch in den GM-M Φ die jeweilige GTPasen, wahrscheinlich als Folge der GTPase-Gendeletion, im Vergleich zu M-M Φ (LysMCre), die als M-M Φ (wt) bezeichnet werden, und GM-M Φ (LysMCre), die als GM-M Φ (wt) bezeichnet werden, stark reduziert waren (Abb.3.3).

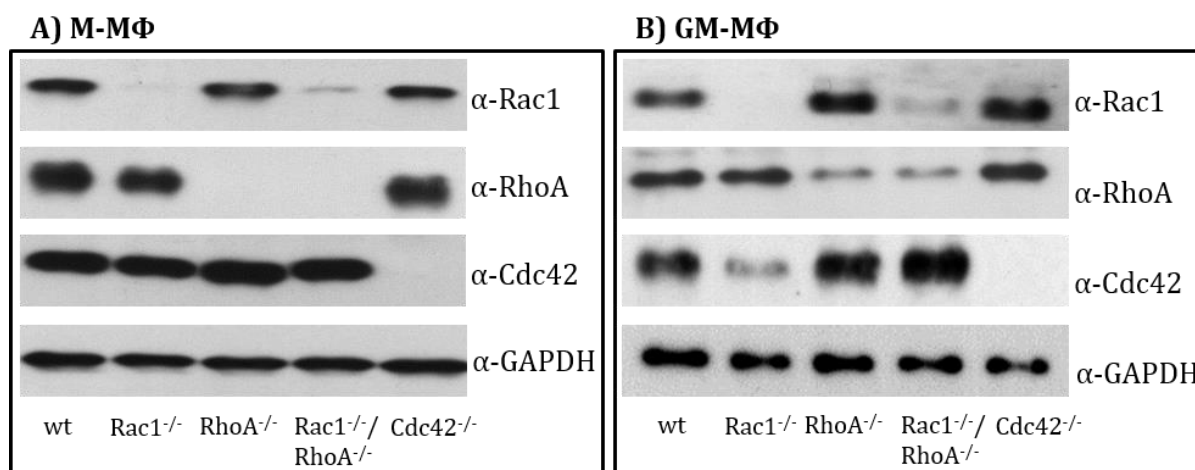


Abb. 3.3: Immunoblot zum Nachweis von GTPasen in A) M-M Φ und B) adhären GM-M Φ . Gesamtzelllysate von 1×10^5 Zellen wurden mittels einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt und GTPasen nach Immunoblot mit spezifischen anti-GTPase-Antikörpern, wie angezeigt, detektiert.

Neben den M-M Φ und den adhären GM-M Φ wurden auch die mit GM-CSF-differenzierten Suspensionszellen, die unreifen Dendritischen Zellen (DCs) und nach Stimulierung mit LPS sogenannte reifen DCs (Lutz *et al.*, 1999), auf das Vorhandensein der jeweiligen GTPasen untersucht. Auch in nicht-adhären DCs ist eine starke Reduzierung der jeweiligen GTPase feststellbar (Abb.3.4).

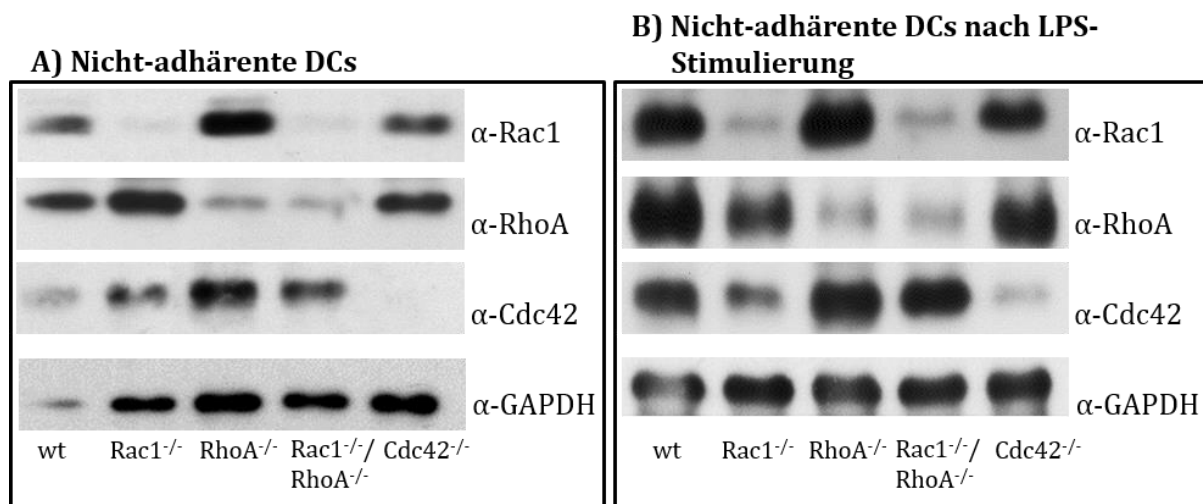


Abb. 3.4: Immunoblot zum Nachweis von GTPasen in nicht-adhärenenten DCs vor (A) und nach LPS (100ng/ml)-Stimulierung (B). Gesamtzelllysate von 1×10^5 Zellen wurden mittels einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt und GTPasen nach Immunoblot mit spezifischen anti-GTPase-Antikörpern, wie angezeigt, detektiert.

In Tabelle 3.1 ist zusammenfassend die Menge der GTPasen in den jeweiligen Zelltypen semiquantitativ dargestellt. Unterschiede in der Präsenz anderer als der deletierten GTPasen wurden nicht untersucht.

Tab. 3.1: Semiquantitativer Vergleich der der GTPase-Menge in M-MΦ und GM-MΦ anhand der Immunoblots. (n.d.: nicht detektiert, (+):gering nachweisbar, +: nachweisbar, ++: deutlich nachweisbar, +++: sehr stark nachweisbar)

	M-MΦ			adhärenente GM-MΦ			nicht-adhärenente DCs					
							unstimuliert			LPS-stimuliert		
	Rac1	RhoA	Cdc42	Rac1	RhoA	Cdc42	Rac1	RhoA	Cdc42	Rac1	RhoA	Cdc42
wt	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	+++	+++	++
Rac1^{-/-}	(+)	+++	+++	n.d.	+++	+	(+)	+++	++	(+)	++	+
RhoA^{-/-}	+++	n.d.	+++	+++	(+)	+++	+++	(+)	+++	+++	(+)	+++
Rac1^{-/-}/ /RhoA^{-/-}	(+)	n.d.	+++	(+)	(+)	+++	(+)	(+)	+++	(+)	(+)	+++
Cdc42^{-/-}	+++	+++	n.d.	+++	+++	n.d.	+++	+++	n.d.	+++	+++	n.d.

3.3 Vergleich von Zellzahl und Morphologie differenzierter Makrophagen

Während der Inkubation von KMZ mit M-CSF kommt es zur Differenzierung und Proliferation zu Knochenmarkmakrophagen (M-MΦ), wobei man nach der Aussaat von 2×10^6 KMZ pro Petrischale (9,4 cm Durchmesser) nach 12 Tagen etwa 2×10^6 M-MΦ(wt) (Kontrollmakrophagen) erhält. Da Neutrophile absterben und nicht-adhärenente Zellen entfernt wurden, muss es zu einer deutlichen Makrophagenproliferation gekommen sein. Eine Gendeletion für *Rac1* (M-MΦ(*Rac1*^{-/-})) und *RhoA* (M-MΦ(*RhoA*^{-/-})) wirkt sich kaum auf die Ausbeute der differenzierten Zellen aus, obwohl sich bei

Deletion der Gene für *Rac1* und *RhoA* (Doppeldeletion) mehr KMZ zu M-MΦ(*Rac1*^{-/-}/*RhoA*^{-/-}) differenzieren. Im Vergleich dazu war die Ausbeute von 2x10⁶ KMZ von *Cdc42*^{-/-} Mäusen nach Differenzierung zu M-MΦ(*Cdc42*^{-/-}) um 50 % reduziert (s. Abb. 3.5).

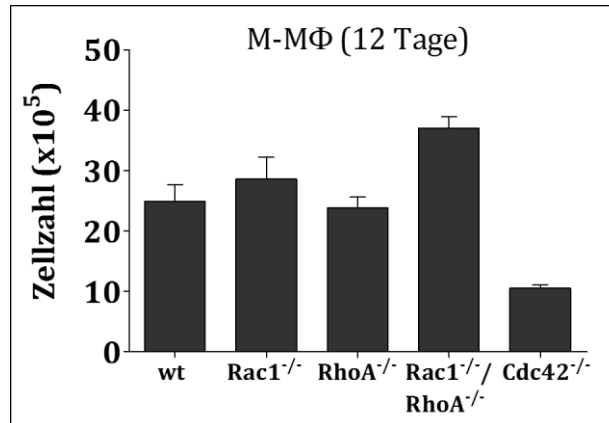


Abb. 3.5: Anzahl von Zellen unterschiedlicher LysMCre GTPase-knockout Mäuse, die sich aus KMZ zu M-MΦ differenzieren. Knochenmarkzellen (2x10⁶) wurden in 8 ml Medium in eine Petrischale (Durchmesser 9,4 cm) ausgesät und mit M-CSF (10 ng/ml) stimuliert. Nach 12 Tagen wurde die Anzahl der adhärennten Zellen (Mittelwert von Triplika und Standardabweichung) bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungen. wt (Kontrolle): M-MΦ(LysMCre), *Rac1*^{-/-}, *RhoA*^{-/-}, *Rac1*^{-/-}/*RhoA*^{-/-} bzw. *Cdc42*^{-/-}: differenzierte KMZ aus Mäusen mit LysMCre-vermittelter Deletion der jeweiligen GTPase-Gene *Rac1*, *RhoA*, *Rac1/RhoA* oder *Cdc42*.

Die Deletion von Rho GTPasen kann Auswirkungen auf die Morphologie der Zellen haben (Wheler *et al.*, 2006). In diesen Untersuchungen konnte hinsichtlich der Morphologie von M-MΦ(*Rac1*^{-/-}) im Vergleich zu M-MΦ(wt) kein deutlicher Unterschied beobachtet werden. M-MΦ(*RhoA*^{-/-}) hingegen sehen mikroskopisch nach Stimulierung mit LPS größer als die M-MΦ(wt) aus und M-MΦ(*Cdc42*^{-/-}) erscheinen kleiner und runder. Durch die Stimulierung mit LPS kommt es zur stärkeren Adhärenz der Zellen an den Gefäßboden, es bilden sich Fortsätze und die M-MΦ nehmen elongierte Formen an (Williams and Ridley, 2000) (Abb.3.6).

Charakterisierungen der M-MΦ dienen als Vorversuche für Untersuchungen zu Veränderungen des Kohlenstoffmetabolismus nach *Listeria*-Infektion in primären M-MΦ im Vergleich zur Makrophagenzelllinie J774A.1 (Gillmaier *et al.*, 2012).

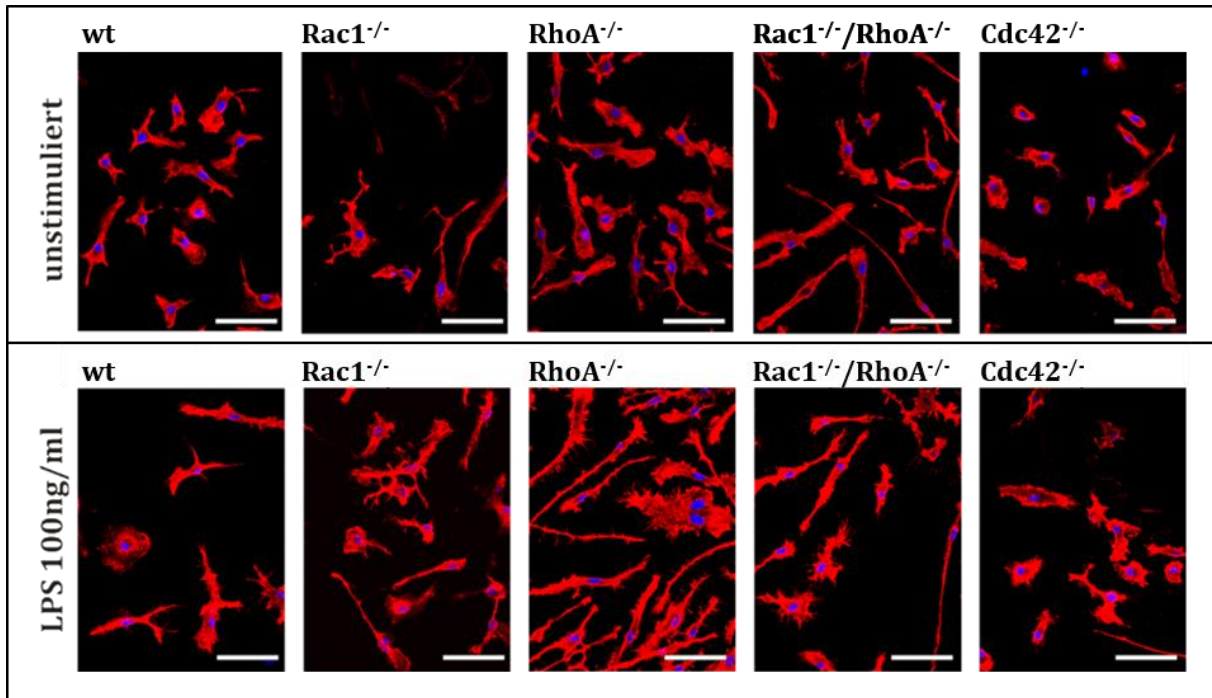


Abb.3.6: Mikroskopische Aufnahme von M-MΦ. Dargestellt ist die Immunfluoreszenzfärbung (mikroskopische Aufnahme) von unstimulierten (obere Reihe) oder mit LPS (100 ng/ml) für 16 h stimulierten M-MΦ (untere Reihe). Gezeigt ist das Actinzytoskelett (gefärbt mit anti-Aktin Antikörper und Alexa-Fluor 555 (rot)) und der Zellkern (gefärbt mit DAPI (blau)). Die Balkenlänge entspricht 50 μ m. Die jeweilige Deletion der GTPase-Gene ist angegeben. wt (Kontrolle): M-MΦ(LysMCre), *Rac1*^{-/-}, *RhoA*^{-/-}, *Rac1*^{-/-}/*RhoA*^{-/-} bzw. *Cdc42*^{-/-}: differenzierte KMZ aus Mäusen mit LysMCre-vermittelter Deletion der jeweiligen GTPase-Gene *Rac1*, *RhoA*, *Rac1/RhoA* und *Cdc42*.

Bei der Aussaat von 2×10^6 KMZ und anschließender Differenzierung mit GM-CSF (20 ng/ml) für 10 Tage entstehen neben adhärenenten Zellen auch nicht-adhärenente Zellen. In den hier beschriebenen Versuchen wurden die adhärenenten Zellen verwendet, die im Folgenden als GM-MΦ bezeichnet werden. Vergleicht man die Anzahl der adhärenenten Zellen (Ausbeute) der verschiedenen Makrophagengenotypen, dann ergibt sich eine gleiche Zellzahl an GM-MΦ(*Rac1*^{-/-}) im Vergleich zu GM-MΦ(wt), aber relativ weniger GM-MΦ(*RhoA*^{-/-}) (Abb. 3.7). Die verringerte GM-MΦ(*RhoA*^{-/-})-Zellausbeute wird auch für GM-MΦ(*Rac1*^{-/-}/*RhoA*^{-/-}) festgestellt (50% weniger adhärenente Zellen). Im Vergleich dazu ist die Zellausbeute der adhärenenten GM-MΦ(*Cdc42*^{-/-}) deutlich höher im Vergleich zu GM-MΦ(wt) (Abb.3.7).

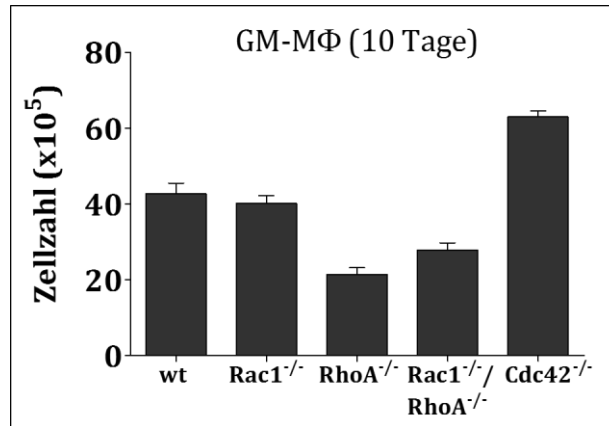


Abb.3.7: Anzahl von differenzierten KMZ unterschiedlicher LysMCre GTPase-knockout-Mäuse nach GM-MΦ (20 ng/ml) Stimulierung. KMZ (2×10^6 Zellen) wurden in 8 ml Medium in eine Petrischale (9,4 cm Durchmesser) ausgesät und mit GM-CSF (20 ng/ml) stimuliert. Nach 10 Tagen wurde die Anzahl der adhärenen Zellen (Mittelwert von Triplika und Standardabweichung) bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungen. wt (Kontrolle): M-MΦ(LysMCre), Rac1^{-/-}, RhoA^{-/-}, Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-} bzw. Cdc42^{-/-}: differenzierte KMZ aus Mäusen mit LysMCre-vermittelter Deletion der jeweiligen GTPase-Gene *Rac1*, *RhoA*, *Rac1/RhoA* und *Cdc42*.

Weiterhin konnte wie bei den M-MΦ festgestellt werden, dass die Gendeletion für *RhoA* oder *Cdc42* einen Einfluss auf die Morphologie der GM-MΦ hat. Rac1-deletierte GM-MΦ zeigen morphologisch keinen Unterschied zu GM-MΦ(wt). GM-MΦ(RhoA^{-/-}) sind jedoch größer und teilweise doppelkernig, möglicherweise, da durch fehlendes RhoA die Zytokinese gestört ist (Yoshizaki *et al.*, 2004). GM-MΦ(Cdc42^{-/-}) sind kleiner und runder als GM-MΦ(wt) (Abb.3.8).

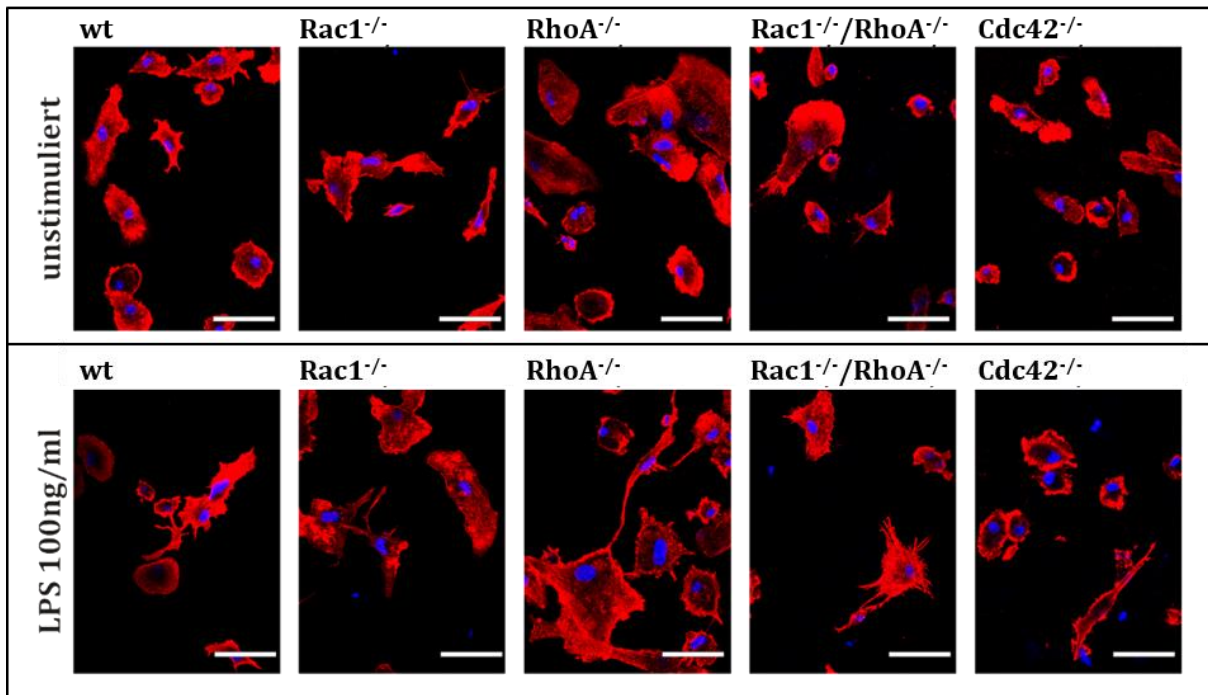


Abb.3.8: Mikroskopische Aufnahme von GM-MΦ. Dargestellt ist die Immunfluoreszenzfärbung von unstimulierten (obere Reihe) oder mit LPS (100 ng/ml) für 16 h stimulierten GM-MΦ (untere Reihe). Abgebildet ist das Aktinzytoskelett (angefärbt mit anti-Aktin Antikörper und Alexa-Fluor 555 (rot)) und der Zellkern (angefärbt mit DAPI (blau)). Die Balkenlänge entspricht 50 µm. Die jeweilige Deletion der GTPase-Gene ist angegeben. wt (Kontrolle): M-MΦ(LysMCre), Rac1^{-/-}, RhoA^{-/-}, Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-} bzw. Cdc42^{-/-}: differenzierte KMZ aus Mäusen mit LysMCre-vermittelter Deletion der jeweiligen GTPase-Gene *Rac1*, *RhoA*, *Rac1/RhoA* und *Cdc42*.

3.4. Analyse der Oberflächenmarker auf Knochenmarkmakrophagen

3.4.1 Nachweis der M-MΦ-Oberflächenmarker

Immunzellen können mittels Antikörpern, die spezifische Oberflächenantigene erkennen, charakterisiert werden. Bei M-MΦ können laut Literatur die Marker CD11b, F4/80, aber nicht CD11c nachgewiesen werden. Da Rho GTPasen nicht nur auf Zytoskeletumlagerungen wirken, sondern auch auf Map-Kinase-Kaskaden (über PAK, ROCK) Einfluss nehmen, könnten sie auch die Differenzierung der M-MΦ beeinflussen. Deshalb wurden M-MΦ mit spezifischen Antikörpern gegen Differenzierungsantigene hämatopoetischer Zellen mittels FACS-Analyse charakterisiert. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die M-MΦ(wt) und die M-MΦ(GTPase^{-/-}) im gleichen Maße die wichtigsten Differenzierungsmarker CD11b und F4/80, aber nicht CD11c exprimieren (Abb. 3.9). In der vorliegenden Arbeit wurden für die jeweiligen GTPase-depletierten Zellen farbige Darstellungen gewählt. Dabei entspricht schwarz den MΦ(wt), rot den MΦ(Rac1^{-/-}), blau den MΦ(RhoA^{-/-}), violett den MΦ(Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-}) und grün den MΦ(Cdc42^{-/-}).

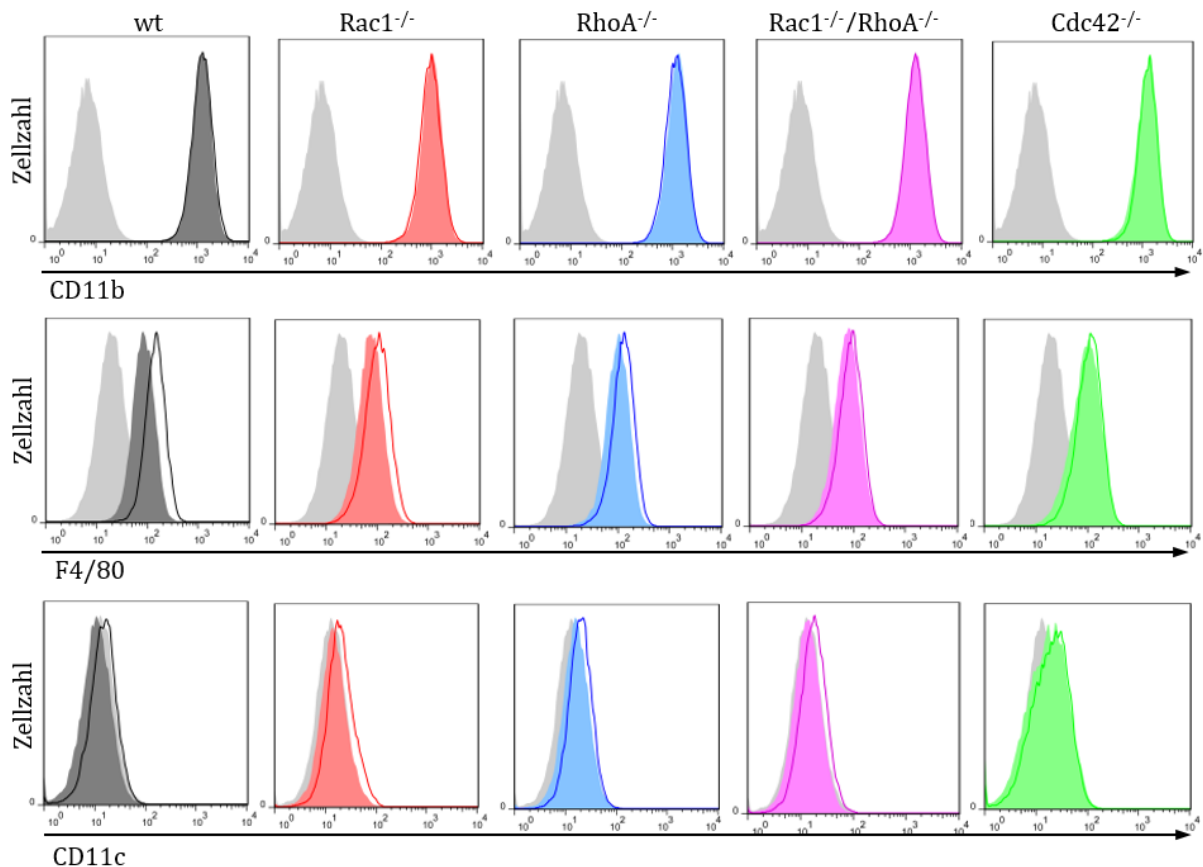


Abb.3.9: FACS-Analyse von M-MΦ hinsichtlich CD11b, F4/80 und CD11c. Gezeigt ist die Oberflächenfärbung von CD11b (obere Reihe), F4/80 (mittlere Reihe) und CD11c (untere Reihe) auf M-MΦ. Die hellgraue Kurve stellt ungefärbte Zellen dar, die gefüllte Kurve zeigt unstimulierte Zellen nach Antikörperbeladung und die ungefüllte Kurve mit 100 ng/ml LPS für 16 h stimulierte Zellen nach Antikörperbeladung. Es wurden mindestens 20000 Ereignisse gemessen (entspricht „Zellzahl“ auf der Ordinate). Die fehlende Skalierung der Y-Achse entsteht durch die Überlagerung mehrerer Histogramme zu einem Histogramm zur besseren Darstellung der Veränderung der Oberflächenmarkerexpression mittels der Software FlowJo. Die Deletion des jeweiligen GTPase-Gens ist angegeben.

Neben CD11b, F4/80 und CD11c wurden auch die Oberflächenantigene CD80 und CD86 sowie MHC I und MHC II untersucht, die für die T-Zell-Aktivierung wichtig sind. Auf den M-M Φ ist CD80 nachweisbar und die Expression wird durch Stimulierung mit LPS verstärkt. CD86 ist auf den M-M Φ nicht exprimiert. Es gibt keine Unterschiede in der Expression von CD80 und CD86 zwischen den M-M Φ (GTPase^{-/-}) im Vergleich zu M-M Φ (wt) (Abb. 3.10).

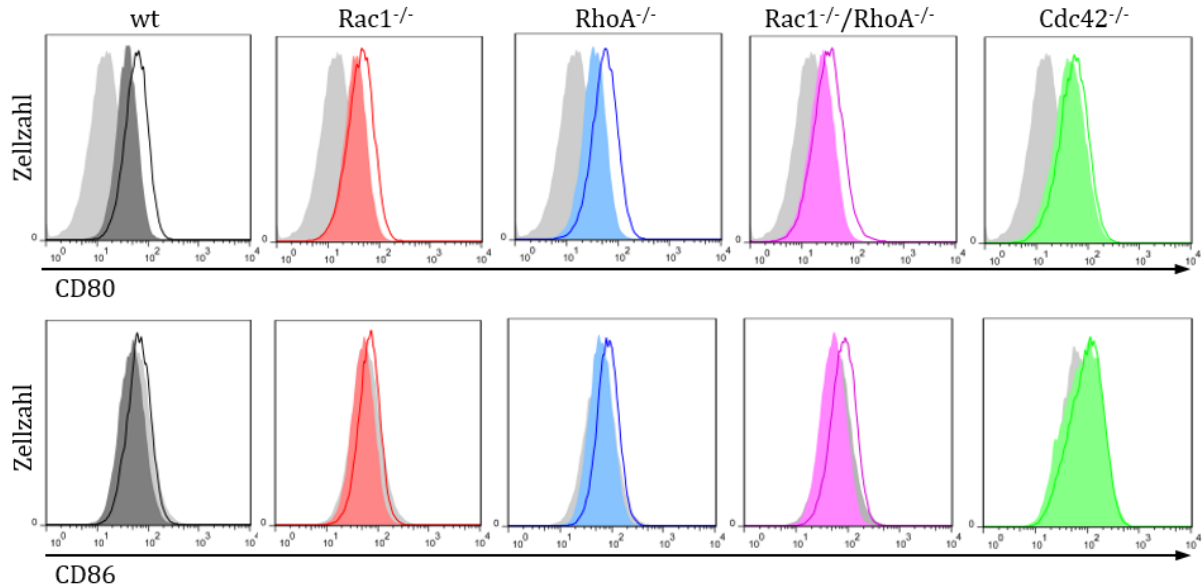


Abb.3.10: FACS-Analyse von M-M Φ hinsichtlich CD80 und CD86. Dargestellt ist die Oberflächenfärbung von CD80 (obere Reihe) und CD86 (untere Reihe) auf M-M Φ . Die hellgraue Kurve stellt ungefärbte Zellen dar, die gefüllte Kurve zeigt unstimulierte Zellen nach Antikörperbeladung und die ungefüllte Kurve mit 100 ng/ml LPS für 16 h stimulierte Zellen nach Antikörperbeladung. Es wurden mindestens 20000 Ereignisse gemessen (entspricht „Zellzahl“ auf der Ordinate). Die fehlende Skalierung der Y-Achse entsteht durch die Überlagerung mehrerer Histogramme zu einem Histogramm zur besseren Darstellung der Veränderung der Oberflächenmarkereexpression mittels der Software FlowJo. Die Deletion des jeweiligen GTPase-Gens ist angegeben.

MHC-I ist auf M-M Φ exprimiert und wird durch Stimulierung mit LPS hochreguliert. MHC-II ist kaum auf den nicht-stimulierten Zellen nachweisbar und bleibt unverändert auch nach Stimulierung mit LPS. Das Expressionsprofil von MHC-I und MHC-II in den hier verwendeten M-M Φ ist gleich (Abb.3.11).

Ergebnisse

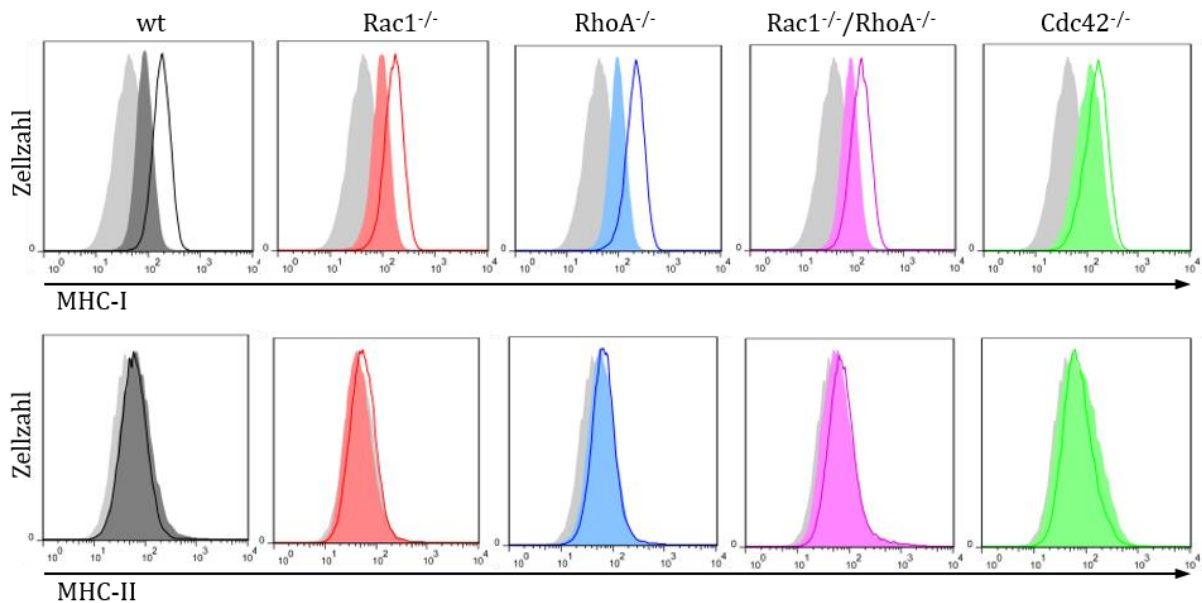


Abb.3.11: FACS-Analyse von M-MΦ hinsichtlich MHC-I und MHC-II. Dargestellt ist die Oberflächenfärbung von MHC-I (obere Reihe) und MHC-II (untere Reihe) auf M-MΦ. Die hellgraue Kurve stellt ungefärbte Zellen dar, die gefüllte Kurve zeigt unstimulierte Zellen nach Antikörperbeladung und die ungefüllte Kurve mit 100 ng/ml LPS für 16 h stimulierte Zellen nach Antikörperbeladung. Es wurden mindestens 20000 Ereignisse gemessen (entspricht „Zellzahl“ auf der Ordinate). Die fehlende Skalierung der Y-Achse entsteht durch die Überlagerung mehrerer Histogramme zu einem Histogramm zur besseren Darstellung der Veränderung Oberflächenmarkerexpression mittels der Software FlowJo. Die Deletion des jeweiligen GTPase-Gens ist angegeben.

Da in dieser Arbeit der Einfluss der Rho GTPasen auf die TLR-Signalkaskade untersucht werden sollte, wurde ebenfalls die Expression von TLR2 und TLR4 in die FACS-Analyse eingeschlossen. TLR2 ist bereits in unstimulierten Zellen auf der Oberfläche detektierbar und wird nach Stimulierung mit LPS stärker exprimiert (Abb.3.12). Oberflächen-TLR4 kann sowohl in unstimulierten Zellen als auch in stimulierten Zellen mit den bei der FACS-Analyse verwendeten Mitteln nicht nachgewiesen werden. Da TLR4 auch mit endosomalen Membranen assoziiert ist, wurde TLR4 in Gesamtzelllysaten mittels SDS-PAGE und anschließend Immunoblot nachgewiesen. Hier konnte kein Unterschied im Expressionsmuster von TLR4 beobachtet werden (Abb.3.13). Des Weiteren wurde das LPS-Bindeprotein CD14 als essentieller Co-Faktor für TLR4 mittels FACS-Analyse nachgewiesen. Hier konnte ebenfalls wie bei TLR2 beobachtet werden, dass CD14 auf der Oberfläche vorhanden ist und die Oberflächendichte von CD14 nach Inkubation mit LPS zunimmt.

Ergebnisse

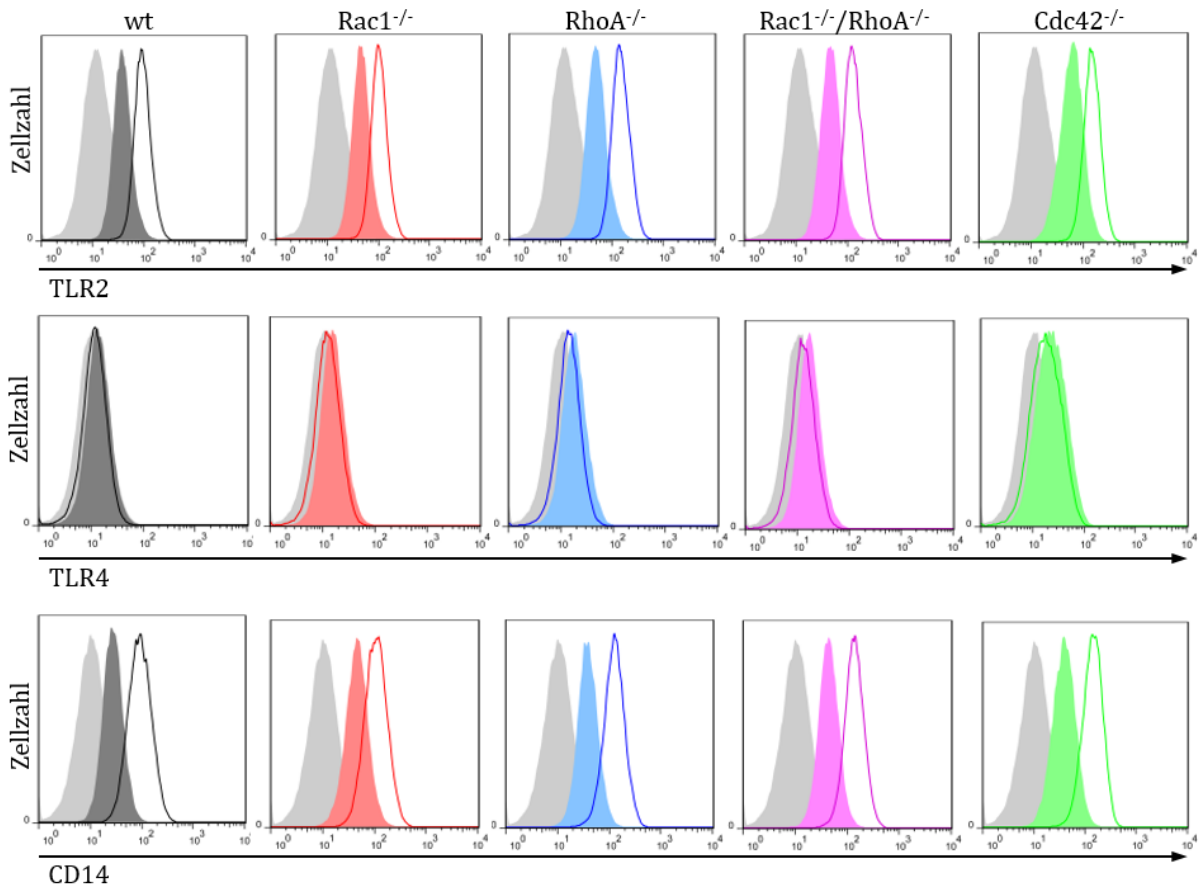


Abb.3.12: FACS-Analyse von M-MΦ hinsichtlich TLR2, TLR4 und CD14. Dargestellt ist die Oberflächenfärbung von TLR2 (obere Reihe), TLR4 (mittlere Reihe) und CD14 (untere Reihe) auf M-MΦ. Die hellgraue Kurve stellt ungefärbte Zellen dar, die gefüllte Kurve zeigt unstimulierte Zellen nach Antikörperbeladung und die ungefüllte Kurve mit 100 ng/ml LPS für 16 h stimulierte Zellen nach Antikörperbeladung. Es wurden mindestens 20000 Ereignisse gemessen (entspricht „Zellzahl“ auf der Ordinate). Die fehlende Skalierung der Y-Achse entsteht durch die Überlagerung mehrerer Histogramme zu einem Histogramm zur besseren Darstellung der Veränderung der Oberflächenmarkerexpression mittels der Software FlowJo. Die Deletion des jeweiligen GTPase-Gens ist angegeben.

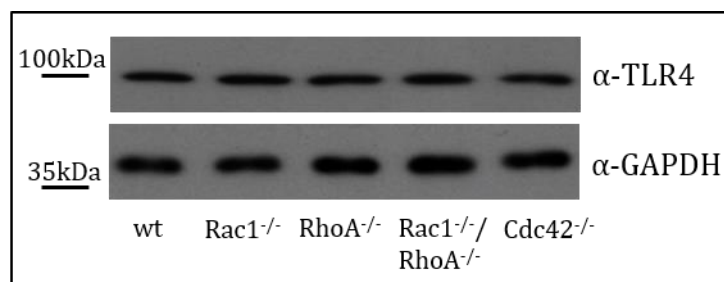


Abb.3.13: Immunoblot zum Nachweis von TLR4 in M-MΦ. TLR4 wurde im Vergleich zum Haushaltsgen GAPDH im Gesamtzelllysate von unstimulierten M-MΦ mit oder ohne Deletion der jeweiligen GTPase-Gene mit spezifischen Antikörpern mittels Immunoblot nachgewiesen. Hierzu wurden $1,5 \times 10^5$ M-MΦ durch Zugabe von 20 μ l Probenpuffer lysiert, 4,5 μ l pro Spur auf ein SDS-Gel geladen und die Proteine auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert. Die Deletion des jeweiligen GTPase-Gens sowie der wt ist angegeben.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Depletion einer oder mehrerer Rho GTPasen in M-MΦ keinen Einfluss auf den Differenzierungszustand und auf die Expression von hier untersuchten Oberflächenstrukturen hat.

3.4.2 Nachweis der GM-M Φ -Oberflächenmarker

Nach Fleetwood *et al.*, 2007 und Lacey *et al.*, 2012 führt die Differenzierung von KMZ mit GM-CSF zu einem Makrophagenzelltyp mit charakteristischen Makrophagenmarkern. Für die hier beschriebenen Versuche wurden neben den M-M Φ ebenfalls mit GM-CSF differenzierte KMZ verwendet. Diese Zellen sind als Suspensionszellen nach Stimulierung mit LPS in der Literatur als reife Dendritische Zellen (DCs) beschrieben (Lutz *et al.*, 1999). Durch die Inkubation mit GM-CSF entwickeln sich neben den Suspensionszellen auch adhärenente Zellen, die als Makrophagen mit Ähnlichkeit zu M1 Makrophagen gelten (Fleetwood *et al.*, 2007) und im Folgenden als GM-M Φ bezeichnet werden. Anhand der hier benutzten typischen Oberflächenmarker unterscheiden sich beide Zelltypen kaum. Im Folgenden sind die FACS-Analysen der adhärenenten GM-M Φ dargestellt. GM-M Φ sind sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach Stimulierung mit LPS CD11b-positiv und CD11c-positiv (Abb. 3.14). Im Vergleich sind GM-M Φ CD11b- und CD11c- positiv und M-M Φ CD11b-positiv und CD11c-negativ (s. Abb.3.9 und Abb.3.14). Die GM-M Φ sind zu 20-30% ebenfalls F4/80 positiv. Beim Vergleich mit den M-M Φ hinsichtlich F4/80 ist F4/80 auf den M-M Φ viel stärker exprimiert als auf den GM-M Φ (Tab. 3.2).

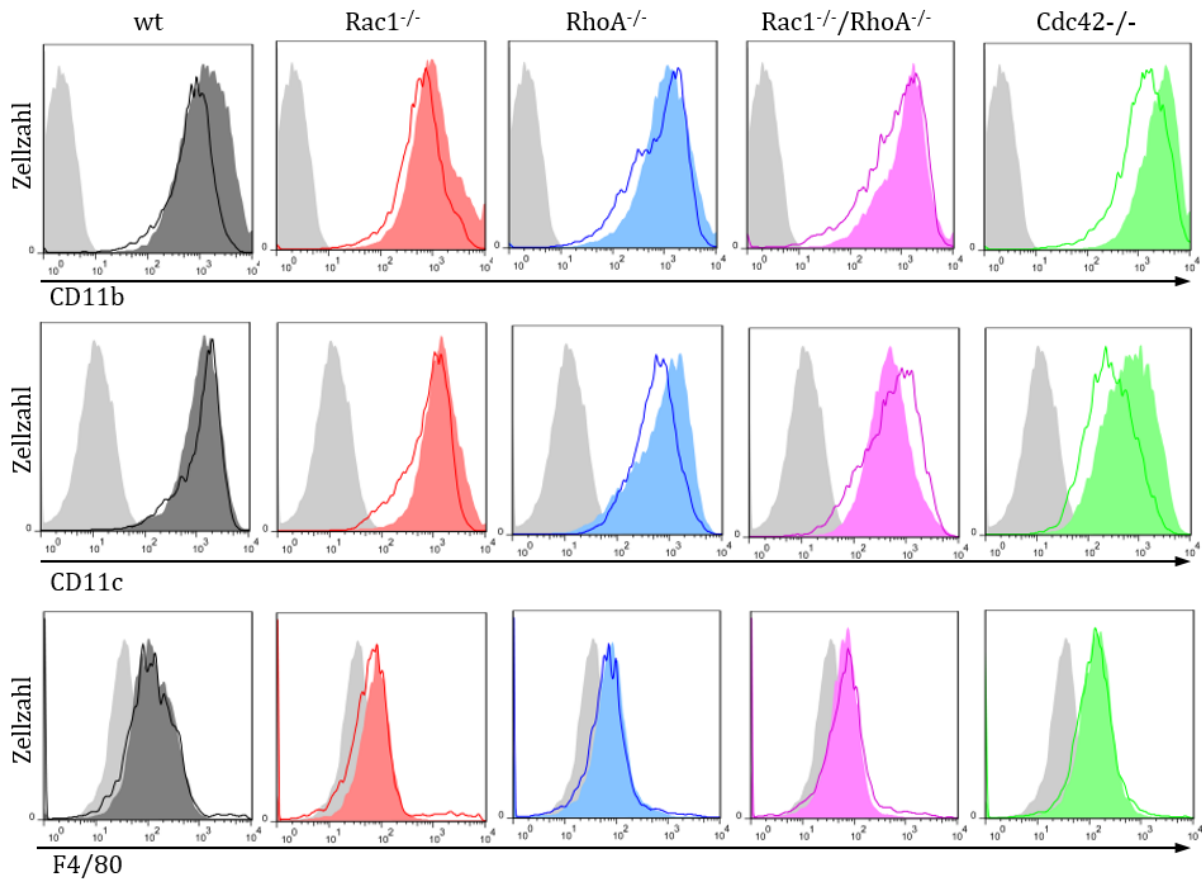


Abb.3.14: FACS-Analyse von GM-MΦ hinsichtlich CD11b, F4/80 und CD11c. Gezeigt ist die Oberflächenfärbung von CD11b (obere Reihe), F4/80 (mittlere Reihe) und CD11c (untere Reihe) auf GM-MΦ. Die hellgraue Kurve stellt ungefärbte Zellen dar, die gefüllte Kurve zeigt unstimulierte Zellen nach Antikörperbeladung und die ungefüllte Kurve mit 100 ng/ml LPS für 16 h stimulierte Zellen nach Antikörperbeladung. Es wurden mindestens 20000 Ereignisse gemessen (entspricht „Zellzahl“ auf der Ordinate). Die fehlende Skalierung der X-Achse entsteht durch die Überlagerung mehrerer Histogramme zu einem Histogramm zur besseren Darstellung der Veränderung der Oberflächenmarkerexpression mittels der Software FlowJo. Die Deletion des jeweiligen GTPase-Gens ist angegeben.

Zur weiteren Charakterisierung und zum Vergleich mit M-MΦ wurden die für die adaptive Immunität wichtigen Oberflächenmarker CD80, CD86 und MHC-I und MHC-II untersucht. Auf den GM-MΦ sind die Marker CD80 und CD86 vorhanden, wobei es nach einer Stimulierung mit LPS zu einer stärkeren Expression von CD80 und CD86 kommt. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den GM-MΦ(wt) und Rho GTPase depletierten GM-MΦ beobachtet werden (Abb.3.15). Die Oberflächenmoleküle MHC-I und MHC-II sind ebenfalls im gleichen Maße auf den hier untersuchten Zellen exprimiert. Nach einer Stimulierung mit 100 ng/ml LPS über Nacht kommt es zu keiner stärkeren Expression von MHC-I, allerdings zu einer stärkeren Expression von MHC-II (Abb.3.16). Vergleicht man die Expressionsstärke der untersuchten Oberflächenantigene M-MΦ und GM-MΦ fällt auf, dass CD80 auf GM-MΦ viel stärker nachweisbar ist und durch eine Stimulierung der Zellen mit LPS sogar noch hochreguliert wird, was bei den M-MΦ so nicht zu sehen war (Tab. 3.2). Ebenfalls wird CD86 auf GM-MΦ nach LPS-Stimulierung verstärkt exprimiert, wobei es auf M-MΦ mit den bei er FACS-Analyse verwendeten Mitteln auch in stimulierten Zellen nicht nachweisbar

ist. MHC-I ist auf beiden Makrophagenarten deutlich nachweisbar, dabei fällt auf, dass eine Stimulierung mit LPS in M-M Φ zu einer Hochregulierung führt, in GM-M Φ jedoch nicht. Auf M-M Φ ist MHC-II in stimulierten Zellen kaum nachweisbar, dagegen wird MHC-II auf GM-M Φ durch eine Stimulierung mit LPS deutlich hochreguliert.

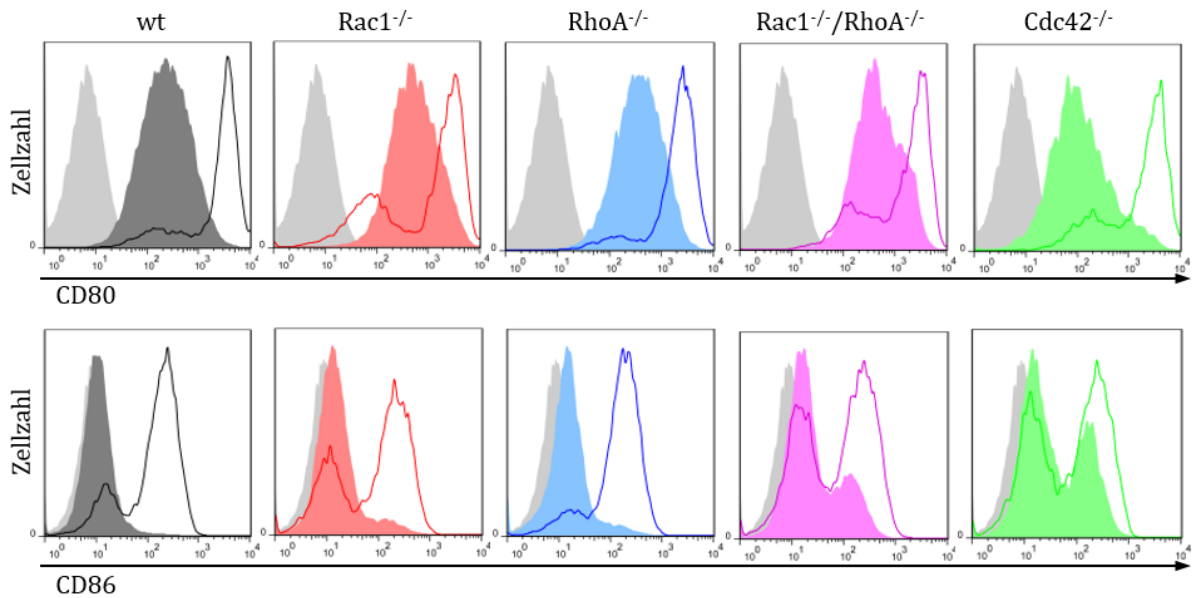


Abb.3.15: FACS-Analyse von GM-M Φ hinsichtlich CD80 und CD86. Gezeigt ist die Oberflächenfärbung von CD80 (obere Reihe) und CD86 (untere Reihe) auf GM-M Φ . Die hellgraue Kurve stellt ungefärbte Zellen dar, die gefüllte Kurve zeigt unstimulierte Zellen nach Antikörperbeladung und die ungefüllte Kurve mit 100 ng/ml LPS für 16 h stimulierte Zellen nach Antikörperbeladung. Es wurden mindestens 20000 Ereignisse gemessen (entspricht „Zellzahl“ auf der Ordinate). Die fehlende Skalierung der Y-Achse entsteht durch die Überlagerung mehrerer Histogramme zu einem Histogramm zur besseren Darstellung der Veränderung der Oberflächenmarkereexpression mittels der Software FlowJo. Die Deletion des jeweiligen GTPase-Gens ist angegeben.

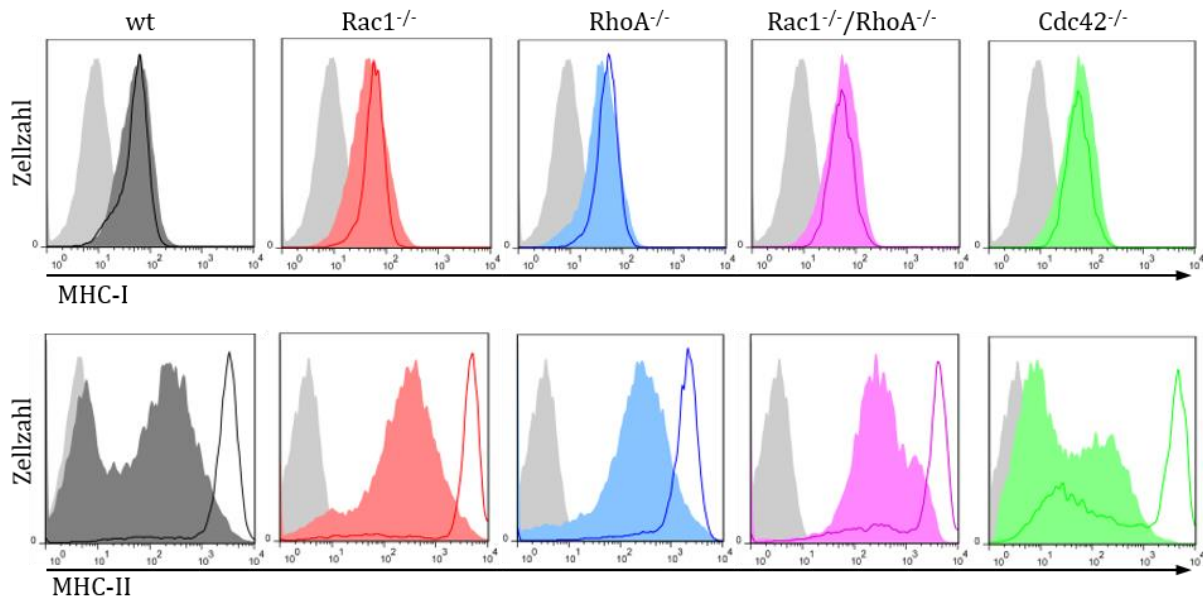


Abb.3.16: FACS-Analyse von GM-MΦ hinsichtlich MHC-I und MHC-II. Gezeigt ist die Oberflächenfärbung von MHC-I (obere Reihe) und MHC-II (untere Reihe) auf GM-MΦ. Die hellgraue Kurve stellt ungefärbte Zellen dar, die gefüllte Kurve zeigt unstimulierte Zellen nach Antikörperbeladung und die ungefüllte Kurve mit 100 ng/ml LPS für 16 h stimulierte Zellen nach Antikörperbeladung. Es wurden mindestens 20000 Ereignisse gemessen (entspricht „Zellzahl“ auf der Ordinate). Die fehlende Skalierung der Y-Achse entsteht durch die Überlagerung mehrerer Histogramme zu einem Histogramm zur besseren Darstellung der Veränderung der Oberflächenmarkereexpression mittels der Software FlowJo. Die Deletion des jeweiligen GTPase-Gens ist angegeben.

Die für die Stimulierung mit TLR-Agonisten notwendigen TLR-Rezeptoren TLR2 und TLR4, die auf der Zelloberfläche exprimiert sind, sowie der Co-Rezeptor CD14 sind ebenfalls etwa in gleicher Dichte auf den GM-MΦ vorhanden. Auffällig ist bei CD14, dass es in GM-MΦ(wt), GM-MΦ(Rac1^{-/-}) und GM-MΦ(Cdc42^{-/-}) zu einer verstärkten Expression nach LPS-Stimulierung kommt, in GM-MΦ(RhoA^{-/-}) und GM-MΦ(Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-}) bleibt das Expressionsniveau jedoch konstant (Abb.3.17). Beim Vergleich der Expression der TLR-Rezeptoren auf beiden Makrophagenarten lassen sich jedoch Unterschiede aufzeigen. TLR2 ist zwar sowohl auf M-MΦ als auch auf GM-MΦ deutlich nachweisbar, wird aber nach einer Stimulierung mit LPS nur in M-MΦ hochreguliert (Tab.3.2). In GM-MΦ bleibt das Expressionslevel nach einer Stimulierung etwa gleich. TLR4 konnte in M-MΦ mittels der verwendeten Mittel zur FACS-Analyse auf der Oberfläche nicht nachgewiesen werden sondern im Gesamtzelllysate durch die Immunoblotanalyse. Auf GM-MΦ konnte TLR4 mittels FACS-Analyse auf der Oberfläche nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass TLR4 stärker auf GM-MΦ exprimiert ist, da TLR4 hier ohne die Signalverstärkung durch einen Sekundärantikörper nachgewiesen wurde. CD14 ist auf der Oberfläche von M-MΦ deutlich nachweisbar und wird durch LPS-Stimulierung verstärkt exprimiert. Auf GM-MΦ ist CD14 ebenfalls deutlich exprimiert, wobei CD14 nach LPS-Stimulierung nicht so deutlich hochreguliert wird wie in M-MΦ.

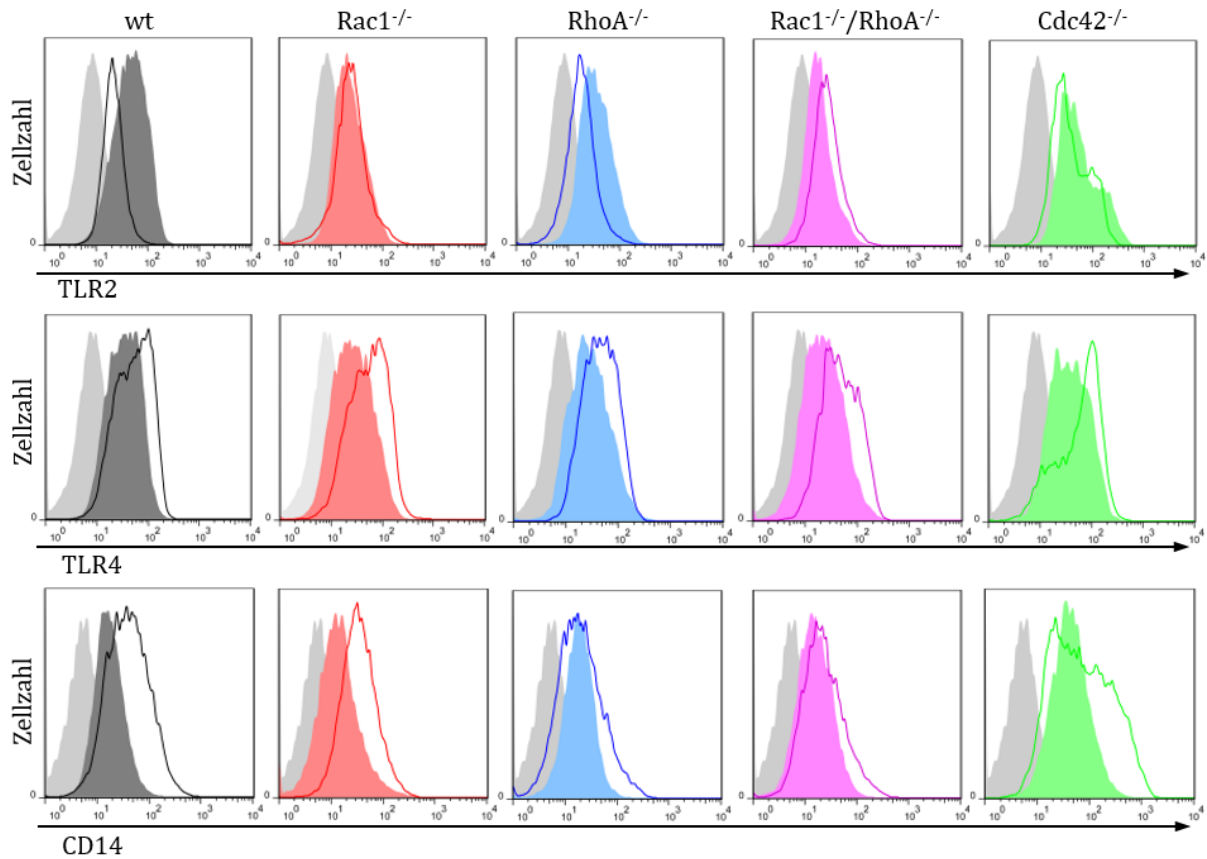


Abb.3.17: FACS-Analyse von GM-MΦ hinsichtlich TLR2, TLR4 und CD14. Gezeigt ist die Oberflächenfärbung von TLR2 (obere Reihe), TLR4 (mittlere Reihe) und CD14 (untere Reihe) auf GM-MΦ. Die hellgraue Kurve stellt ungefärbte Zellen dar, die gefüllte Kurve zeigt unstimulierte Zellen nach Antikörperbeladung und die ungefüllte Kurve mit 100 ng/ml LPS für 16 h stimulierte Zellen nach Antikörperbeladung. Es wurden mindestens 20000 Ereignisse gemessen (entspricht „Zellzahl“ auf der Ordinate). Die fehlende Skalierung der Y-Achse entsteht durch die Überlagerung mehrerer Histogramme zu einem Histogramm zur besseren Darstellung der Veränderung der Oberflächenmarkerexpression mittels der Software FlowJo. Die Deletion des jeweiligen GTPase-Gens ist angegeben.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Deletion eines oder mehrerer GTPase-Gene keinen Einfluss auf die Expression von charakteristischen Oberflächenmarkern sowohl in M-MΦ als auch in GM-MΦ hat und dass auch nach Stimulierung der Zellen mit LPS die gleiche Veränderung in der Intensität der Oberflächenmarker (bis auf CD14) zu beobachten ist. Die charakteristischen Makrophagenmarker CD11b und F4/80 sind sowohl auf M-MΦ als auch auf GM-MΦ vorhanden. Beide Zellarten unterscheiden sich wesentlich durch den CD11c-Marker, der auf GM-MΦ, aber nicht auf M-MΦ nachweisbar ist. Ein Unterschied in der Oberflächenexpression der für die adaptive Immunität wichtigen Oberflächenmarker CD80, CD86, MHC-I und MHC-II zwischen M-MΦ und GM-MΦ wurde nachgewiesen. TLR2, TLR4 sowie CD14 sind bei beiden Makrophagentypen jedoch in unterschiedlicher Intensität nachweisbar. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 3.2 dargestellt.

Tab. 3.2: Semiquantitativer Vergleich der Stärke der Oberflächenantigene auf M-M Φ und GM-M Φ . (-: negativ, +: geringe Oberflächenexpression, ++: starke Oberflächenexpression, +++: sehr starke Oberflächenexpression)

Makrophagen Oberflächenmarker	M-M Φ	GM-M Φ
CD11b	+++	+++
F4/80	++ - +++	+
CD11c	-	+++
CD80	++	+++
CD86	-	+ - +++
MHC-I	++ - +++	++
MHC-II	+	+++
TLR2	++ - +++	++ - +
TLR4	(+)	+ - ++
CD14	++ - +++	+ - ++

3.5 Einfluss der Depletion der GTPasen auf die TLR-Signalwege

Um zu untersuchen, ob die Depletion der GTPase einen Einfluss auf die TLR-vermittelte Signalkaskade hat, wurden Makrophagen der LysMCre GTPase-*knockout* Mäuse mit Agonisten für TLR2, TLR4 und TLR9 stimuliert und die Überstände nach 6 h und 24 h gesammelt, um die sekretierten Zytokine IL-6, IL-12, TNF α und IL-10 quantitativ zu bestimmen.

3.5.1 Einfluss der GTPasen auf TLR-Signalwege in M-M Φ

Durch eine Stimulierung von Makrophagen mit TLR-Agonisten kann es zur Sekretion von proinflammatorischen (z. B. IL-6, IL-12 und TNF α) und antiinflammatorischen Zytokinen (z. B. IL-10) kommen. In den hier durchgeführten Experimenten zeigt sich, dass im Kulturüberstand der M-M Φ nach PAMP-Stimulierung die Menge an IL-12 und IL-6 nach 24 h im Vergleich zu 6 h zunimmt, die Konzentration von TNF α etwa gleich bleibt und die Konzentration von IL-10 bezogen auf die Konzentration (6 h) nach 24 h Rho GTPasen-abhängig verändert. Im Vergleich zu M-M Φ (wt) führt die PAMP-Stimulierung von M-M Φ (Rac1^{-/-}) zu einer geringeren Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und zu einer stärkeren (z.B. nach Stimulierung mit LPS und CpG) oder gleich starken (z.B. nach Stimulierung mit Pam3CSK4) Sekretion von antiinflammatorischem IL-10, wobei diese Effekte am stärksten nach 6 h beobachtet wurden. Beim Vergleich der sekretierten Zytokine von M-M Φ (RhoA^{-/-}) mit denen von M-M Φ (wt) konnte eine verstärkte Sekretion von proinflammatorischem IL-12 und TNF α und eine verminderte Sekretion von IL-10 festgestellt werden (Abb.3.18). Das weist auf eine inverse Rac1-RhoA Beziehung hin: verminderte IL-12 Konzentration und erhöhte IL-10 Konzentration beim Fehlen von Rac1 und *vice versa* bei RhoA-negativen

Makrophagen. Bei M-MΦ mit Doppeldeletion von Rac1 und RhoA konnte ein ähnliches Zytokinmuster für IL-12 und IL-10 aber ein erhöhtes für TNFα und IL-6 im Vergleich zu M-MΦ(wt) festgestellt werden. M-MΦ(Cdc42^{-/-}) sekretierten PAMP-abhängig verstärkt IL-12, verstärkt oder im gleichen Maße TNFα, vermindert IL-6 und vermindert oder im gleichen Maße IL-10. Auch hier ist eine inverse Beziehung von IL-12- zu IL-10-Sekretion feststellbar.

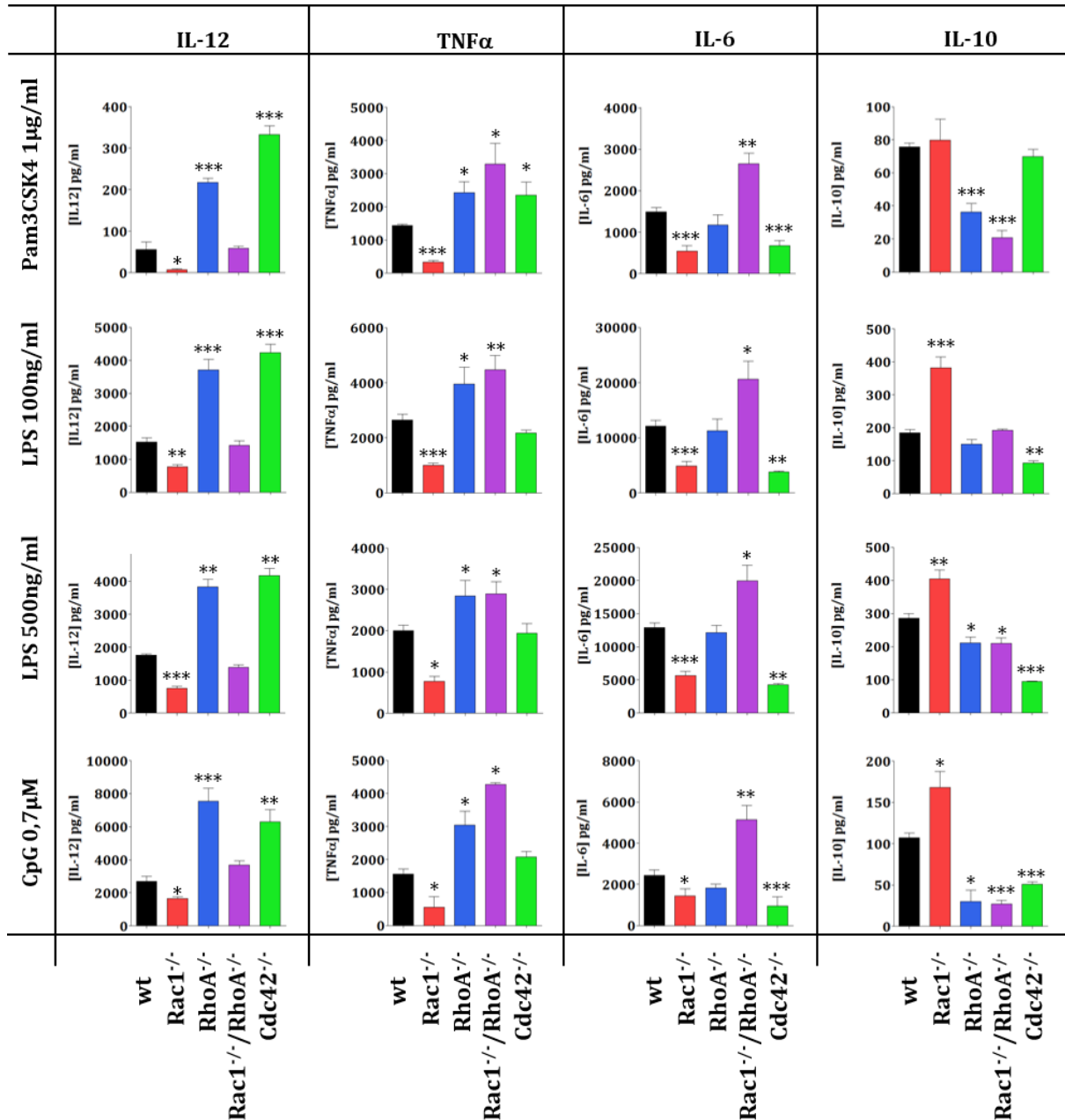


Abb.3.18: Konzentration von M-MΦ sekretierter Zytokine (Kulturüberstand/ELISA) nach 6h Stimulierung mit PAMP. Die Ergebnisse beziehen sich auf 3-fach Bestimmungen eines repräsentativen Experiments (Mittelwert aus Triplika und Standardabweichung), wobei 3x10⁵ M-MΦ pro Kavität einer 12-well Platte ausgesät wurden und mit einem Volumen von 300 µl Zellkulturmedium plus PAMP für den angegebenen Zeitraum stimuliert wurden. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$. Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die Kontrollmakrophagen M-MΦ(wt). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. wt (Kontrolle): M-MΦ(LysMCre), Rac1^{-/-}, RhoA^{-/-}, Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-} bzw. Cdc42^{-/-}: M-MΦ mit LysMCre-vermittelter Deletion der jeweiligen GTPase-Gene Rac1, RhoA, Rac1/RhoA und Cdc42.

Die nach 6 h beobachteten Unterschiede zwischen den Makrophagentypen konnten mit Ausnahme von IL-10 auch nach 24 h festgestellt werden. Nach 24 h war die IL-10 Sekretion von M-MΦ(wt) bei TLR2 und TLR9 Stimulierung stärker als die von M-MΦ(Rac1^{-/-}). Die inverse Beziehung zwischen IL-12- und IL-10-Sekretion, sowie der Rac1^{-/-} / RhoA^{-/-} Antagonismus bleiben auch nach 24 h erhalten (Abb.3.19). Im Kulturüberstand von Zellen ohne PAMP-Zusatz, konnten im ELISA keine Zytokine nachgewiesen werden.

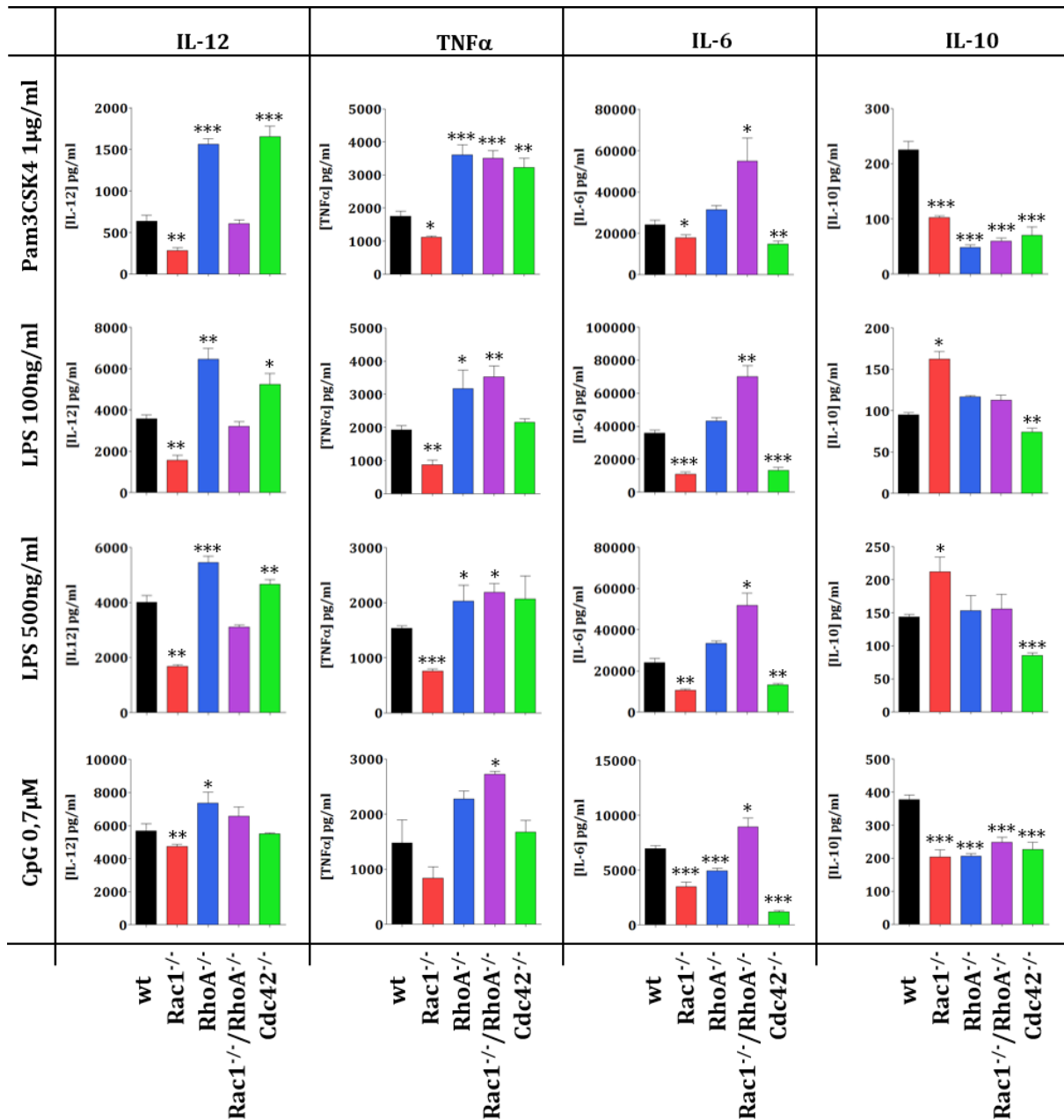


Abb.3.19: Konzentration von M-MΦ sekretierter Zytokine (Kulturüberstand/ELISA) nach 24h Stimulierung mit PAMP. Die Ergebnisse beziehen sich auf 3-fach Bestimmungen eines repräsentativen Experiments (Mittelwert von Tripliaka und Standardabweichung), wobei 3x10⁵ M-MΦ pro Kavität einer 12-well Platte ausgesät wurden und mit einem Volumen von 300 μl Zellkulturmedium plus PAMP für den angegebenen Zeitraum stimuliert wurden. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$. Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die Kontrollmakrophagen M-MΦ(wt). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. wt (Kontrolle): M-MΦ(LysMCre), Rac1^{-/-}, RhoA^{-/-}, Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-} bzw. Cdc42^{-/-}: M-MΦ mit LysMCre-vermittelter Deletion der jeweiligen GTPase-Gene Rac1, RhoA, Rac1/RhoA und Cdc42.

3.5.2 Einfluss der GTPasen auf TLR-Signalwege in GM-MΦ

PAMP-stimulierte GM-MΦ sezernieren überwiegend proinflammatorische Zytokine (inflammatorische Makrophagen Typ 1) (Fleetwood *et al.*, 2007). Die vorliegenden Untersuchungen konnten dies bestätigen. Die Konzentration von sekretiertem IL-12 ist bei GM-MΦ im Vergleich zu M-MΦ stark erhöht und IL-10 stark erniedrigt nach PAMP-Stimulation. IL-10 konnte nicht nach 6 h detektiert werden, sondern erst nach 24 h. GM-MΦ(Rac1^{-/-}) sekretieren nach 24 stündiger Stimulierung von TLR2, TLR4 und TLR9 verglichen mit GM-MΦ(wt) mehr IL-12, etwa gleiche Mengen TNFα und ebenfalls erhöhte Mengen IL-10. Hier konnte nicht, wie in M-MΦ, die inverse Beziehung zwischen IL-12 und IL-10 beobachtet werden (wahrscheinlich auf Grund der heterogenen Zellpopulation). GM-MΦ(RhoA^{-/-}) zeigten erhöhte oder gleiche Konzentrationen von IL-12, TNFα und IL-10. Vergleicht man die Menge von sezernierten Zytokinen von GM-MΦ(Rac1^{-/-}) und GM-MΦ(RhoA^{-/-}), passen die Ergebnisse zur Aufhebung des Rac1^{-/-} / RhoA^{-/-}-Antagonismus bei Doppeldeletion von Rac1 und RhoA. Stimulierte GM-MΦ(Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-}) zeigen verstärkte (TLR2 und TLR9) oder gleiche Mengen (TLR4) an IL-12, weniger TNFα und gleiche Mengen IL-10 im Kulturüberstand. GM-MΦ(Cdc42^{-/-}) sezernieren im Vergleich zur Kontrolle weniger oder gleiche Mengen an proinflammatorischen Zytokinen und verstärkt IL-10 (Abb.3.20 und Abb.3.21). Nicht stimulierte Zellen zeigten keine Sekretion der Zytokine. Obwohl die Depletion der GTPasen ebenfalls bei GM-MΦ festgestellt wurden, scheinen die Rho GTPasen die TLR-Signalwege anders zu beeinflussen als bei M-MΦ, was wahrscheinlich auf die GM-MΦ Zelltypheterogenität zurückzuführen ist.

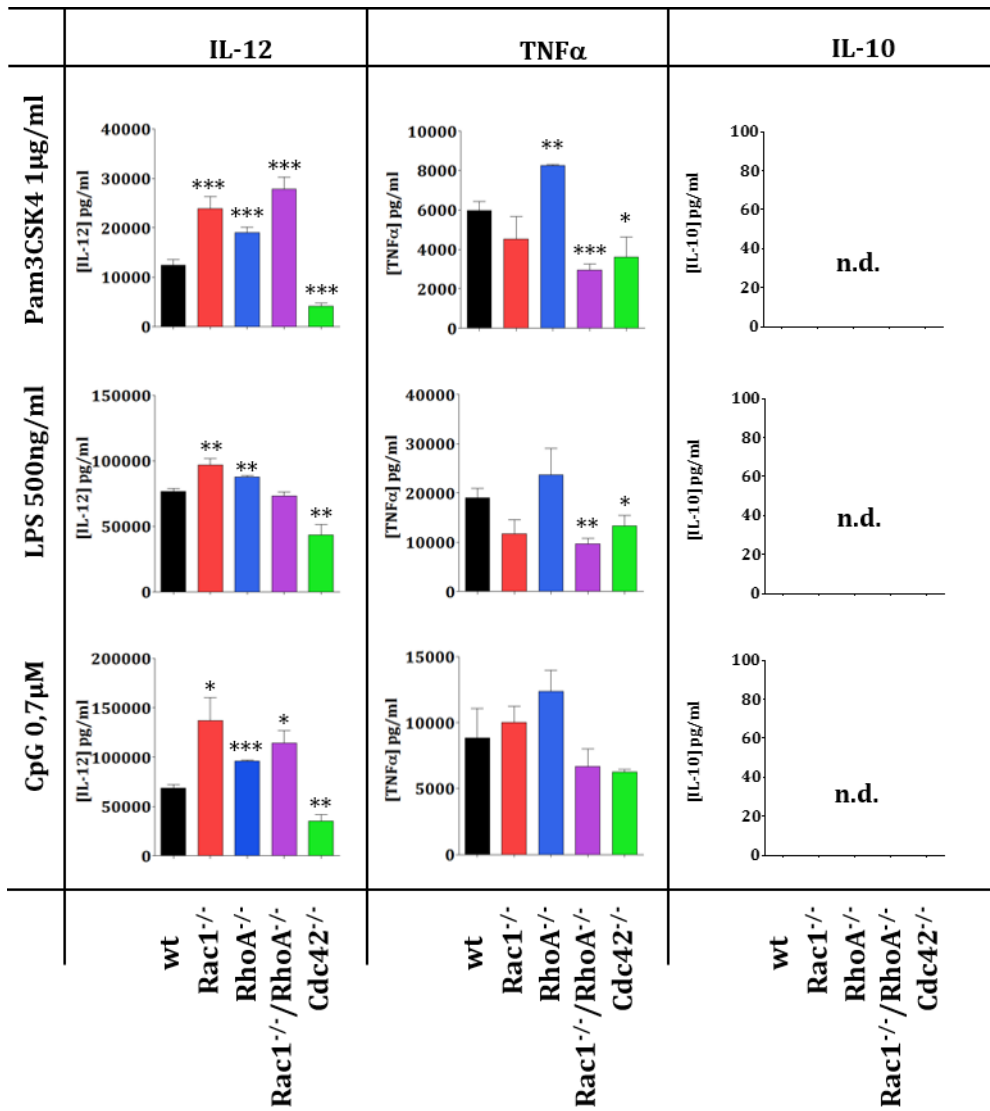


Abb.3.20: Konzentration von GM-MΦ sezernierter Zytokine (Kulturüberstand/ELISA) nach 6 h Stimulierung mit PAMP. Die Ergebnisse beziehen sich auf 3-fach Bestimmungen eines repräsentativen Experiments (Mittelwert aus Triplika und Standardabweichung), wobei 2x10⁵ GM-MΦ pro Kavität einer 12-well Platte ausgesät wurden und mit einem Volumen von 300 µl Zellkulturmedium plus PAMP für den angegebenen Zeitraum stimuliert wurden. n.d.= nicht detektierbar. *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001. Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die Kontrollmakrophagen GM-MΦ(wt). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. wt (Kontrolle): GM-MΦ(LysMCre), Rac1^{-/-}, RhoA^{-/-}, Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-} bzw. Cdc42^{-/-}: GM-MΦ mit LysMCre-vermittelter Deletion der jeweiligen GTPase-Gene *Rac1*, *RhoA*, *Rac1/RhoA* und *Cdc42*.

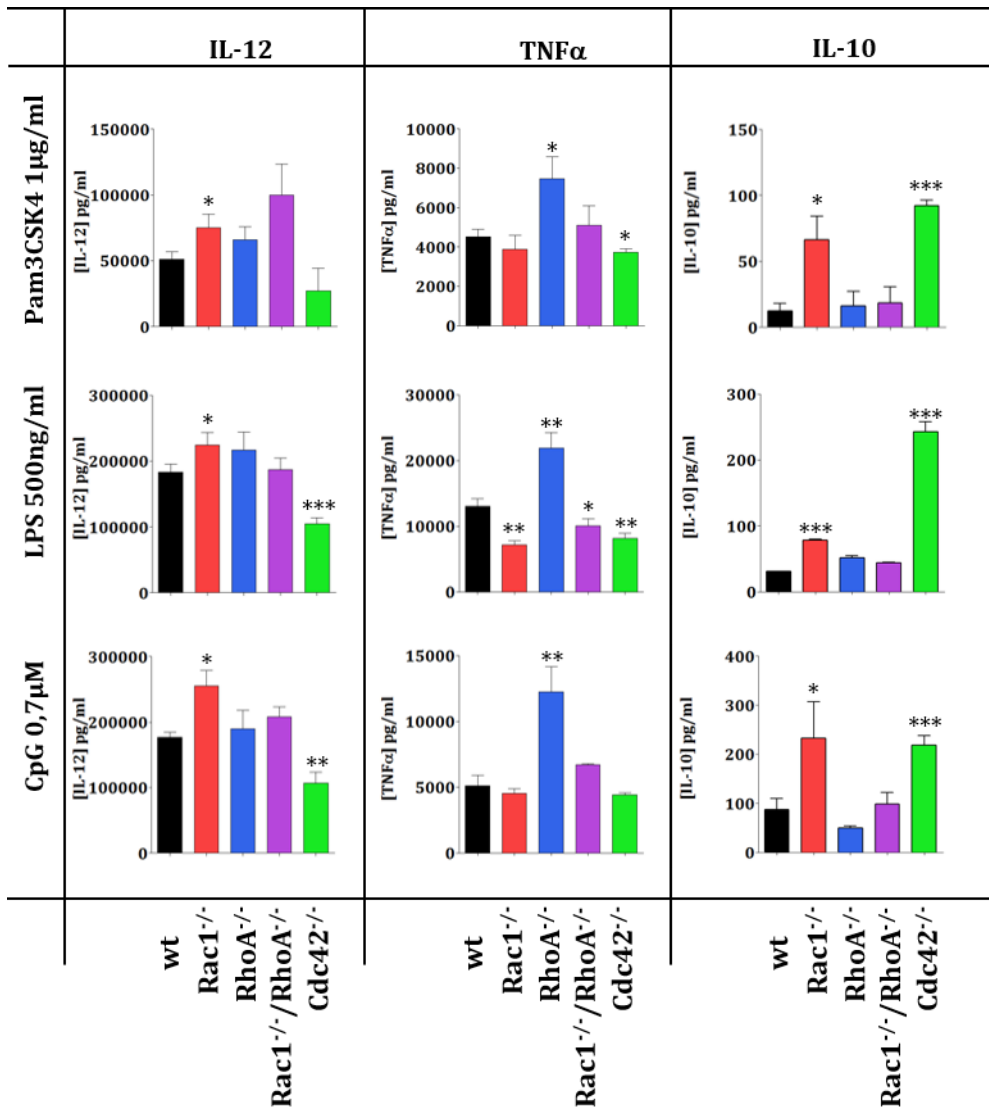


Abb.3.21: Konzentration von GM-MΦ sezernierter Zytokine (Kulturüberstand/ELISA) nach 24 h Stimulierung mit PAMP. Die Ergebnisse beziehen sich auf 3-fach Bestimmungen eines repräsentativen Experiments (Mittelwert von Triplika und Standardabweichung), wobei 2×10^5 GM-MΦ pro Kavität einer 12-well Platte ausgesät wurden und mit einem Volumen von 300 μl Zellkulturmedium plus PAMP für den angegebenen Zeitraum stimuliert wurden. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$. Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die Kontrollmakrophagen GM-MΦ (wt). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. wt (Kontrolle): GM-MΦ (LysMCre), Rac1^{-/-}, RhoA^{-/-}, Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-} bzw. Cdc42^{-/-}: GM-MΦ mit LysMCre-vermittelter Deletion der jeweiligen GTPase-Gene Rac1, RhoA, Rac1/RhoA und Cdc42.

3.5.3 Pseudoprimäre immortalisierte KMZ (iKMZ)

Monozyten- und Makrophagen-ähnliche Zelllinien, die von Leukämiezellen abstammen, werden häufig zur Analyse von Signaltransduktionskaskaden und Erreger-Wirtszell-Interaktionen verwendet. Allerdings unterscheiden sich diese Zelllinien von Primärzellen hinsichtlich der beteiligten Komponenten in Signalkaskaden (Beteiligung verschiedener Isoformen, Papakonstanti *et al.*, 2008). Es wäre deshalb vorteilhaft, Primärzellen aus Knochenmark zu immortalisieren und kon-

trolliert zu differenzieren. 2006 wurde von Wang *et al.* eine Methode beschrieben, die es ermöglicht, Makrophagen und neutrophile Granulozyten aus undifferenzierten Knochenmarkzellen *ex vivo* herzustellen. Diese Methode nutzt die Eigenschaft von Hox-Transkriptionsfaktoren, die Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen zu verhindern, dabei aber ihre Proliferation zu erlauben. Um HoxB8 gezielt zu aktivieren, wurde die Östrogen-bindende Domäne des Östrogenrezeptors an das Protein fusioniert und mittels retroviraler Infektion in Vorläuferzellen exprimiert. Hierdurch wird nach Zugabe von Östrogen HoxB8 aktiviert und die weitere Differenzierung verhindert. Eine Immortalisierung und Proliferation kann jedoch nur stattfinden, wenn dem Kulturmedium entsprechende Zytokine zugesetzt werden. Wang *et al.* beschreiben Methoden zur Differenzierung mit Zugabe von SCF oder GM-CSF. Vorläuferzellen, die nach Östrogenentzug mit SCF enthaltendem Medium inkubiert werden, haben Ähnlichkeit mit neutrophilen Granulozyten, während die Zugabe von GM-CSF zu makrophagenähnlichen Zellen führt. Die HoxB8-Immortalisierungstechnik wurde zunächst in dieser Arbeit erprobt, um aus GTPase-defizienten KMZ entsprechende immortalisierte Makrophagen (iMΦ) zu generieren und dann die TLR-induzierte Zytokinantwort zu untersuchen.

3.5.3.1 Immortalisierte GM-MΦ (GM-iMΦ) mit depletierten GTPasen der Rho-Familie

Ob auch die immortalisierten KMZ eine Depletion der GTPasen nach der Differenzierung mit GM-CSF aufweisen, wurde mittels Immunoblotanalyse untersucht. Hier ist am Beispiel der GM-iMΦ(Rac1^{-/-}), GM-iMΦ(RhoA^{-/-}) und GM-iMΦ(wt) gezeigt, dass eine HoxB8-vermittelte Immortalisierung keinen Einfluss auf die Cre-Rekombinase hat und auch in diesen GM-iMΦ eine Rho GTPase-Gendeletion bzw. die Depletion der entsprechenden Rho GTPasen nachweisbar ist (Abb.3.22).

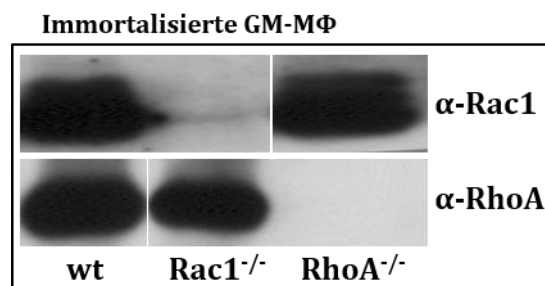


Abb.3.22: Immunoblot zum Nachweis der Depletion von Rac1 und RhoA in GM-iMΦ. Gesamtzelllysate von 1×10^5 GM-iMΦ 12 Tage nach Differenzierung in GM-CSF-haltigem Medium wurden mittels einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt und GTPasen nach Immunoblot mit spezifischen Antikörpern detektiert.

3.5.3.2 Zytokinsekretion von GM-iMΦ nach TLR2-bzw. TLR4-Stimulierung

GM-iMΦ wurden mit Pam3CSK4 (TLR2-Agonist) und LPS (TLR4-Agonist) für 24 h stimuliert und die Zytokine IL-12 und TNFα im Überstand bestimmt. Wie in Abb.3.23 (A) dargestellt, sezernieren GM-iMΦ(Rac1^{-/-}) nach TLR2- bzw. TLR4-Stimulierung für 24 h verstärkt IL-12 und TNFα in den Kulturüberstand verglichen mit GM-iMΦ(wt). Die Konzentration von IL-12 und TNFα im Überstand von GM-iMΦ(RhoA^{-/-}) entspricht etwa der Konzentration, die in GM-iMΦ(wt) detektiert wurde.

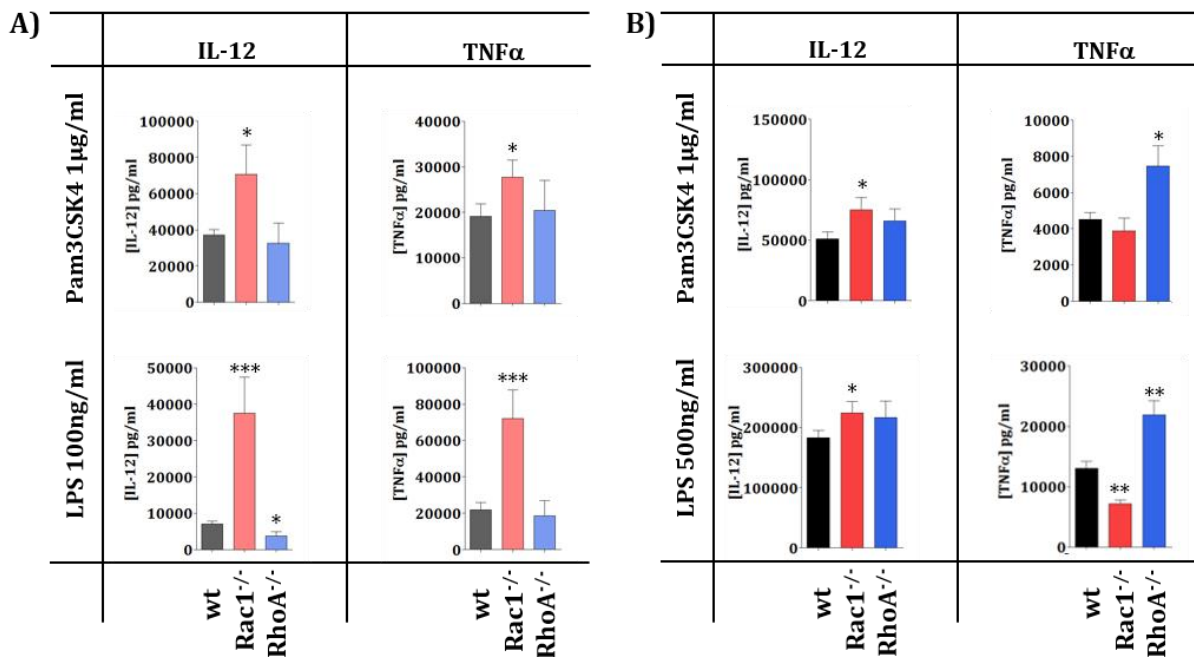


Abb.3.23: Konzentration sekretierter Zytokine von GM-iMΦ und GM-MΦ 24 h nach PAMP-Stimulierung. Die Bestimmung der Konzentration sekretierter Zytokine erfolgte mittels ELISA (3-fach Bestimmung als Mittelwert und Standardabweichung), wobei (A) 2×10^5 GM-iMΦ und (B) 2×10^5 GM-MΦ pro Vertiefung einer 24-well Platte ausgesät wurden und mit einem Volumen von 250 μ l für den angegebenen Zeitraum stimuliert wurden. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$. Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die Kontrollmakrophagen GM-iMΦ(wt). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Versuchen für IL-12 und TNFα. wt (Kontrolle): (A) GM-iMΦ(LysMCre) bzw. (B) GM-MΦ(LysMCre), Rac1^{-/-} bzw. RhoA^{-/-}: (A) GM-iMΦ bzw. (B) GM-MΦ mit LysMCre-vermittelter Deletion der jeweiligen GTPase-Gene *Rac1* und *RhoA*.

Der Vergleich der Zytokinsekretionsprofile von primären GM-MΦ (Abb. 3.23 (B)) und immortalisierten GM-iMΦ (Abb. 3.23 (A)) zeigt, dass GM-iMΦ(Rac1^{-/-}) stärker TNFα in den Kulturüberstand sezernieren als die GM-iMΦ(wt). In den primären GM-MΦ(Rac1^{-/-}) wurde jedoch eine geringere Konzentration von TNFα im Überstand verglichen mit den wt-Kontrollzellen festgestellt. Deutlich erhöht ist die Konzentration von TNFα im Überstand von primären GM-MΦ(RhoA^{-/-}). Die immortalisierten GM-iMΦ(RhoA^{-/-}) sezernieren etwa gleiche Mengen an TNFα in den Überstand wie die

GM-iM Φ (wt). Aufgrund dieser Unterschiede im Zytokinsekretionsprofil von primären und immortalisierten GM-M Φ wurden die folgenden Versuche nur mit primären Makrophagen durchgeführt.

3.6 Quantitative Real-Time PCR zur Bestimmung von Zytokintranskripten

Der Einfluss der GTPasen auf posttranskriptioneller Ebene der TLR-induzierten Zytokine kann mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht werden. Hierbei werden die TLR-induzierten Transkripte von Zytokinen quantitativ mit dem konstitutiv transkribierten Haushaltsgen HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) als Referenz verglichen.

Durch das Anschalten von Signalwegen kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche im Folgenden die Expression von Genen aktivieren. Falls die Rho GTPasen einen Einfluss auf die TLR-Signalwege und damit auf die Transkription von Zytokingenen oder auf die Stabilität der Transkripte haben, sollte man Unterschiede in der mRNA-Menge feststellen können. Nach 3 h und nach 6 h wurde die RNA der PAMP-stimulierten Makrophagen isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Ct (*cycle threshold*)-Werte der amplifizierten Zytokine-cDNA im Vergleich zu amplifizierter cDNA des Haushaltsgens Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) bestimmt (Rey *et al.*, 2000).

3.6.1 Ratiometrische Zytokintranskriptbestimmung in M-M Φ

3 h nach PAMP-Stimulierung der M-M Φ wurden die Transkripte des Zytokingens und die des Referenzgens HPRT mittels RT-PCR quantifiziert und die erhaltenen Werte dargestellt (Abb. 3.24). Die relativen IL-12-Transkriptwerte für M-M Φ (Rac1^{-/-}) sind deutlich kleiner und die der M-M Φ (RhoA^{-/-}) deutlich größer als die der M-M Φ (wt). Im Vergleich dazu sind die relativen IL-10-Transkriptwerte für M-M Φ (Rac1^{-/-}) wesentlich größer als die der M-M Φ (wt). Des Weiteren wurde festgestellt, dass nach 6 h die IL-12 mRNA-Menge in allen Zellen ansteigt und die IL-10 mRNA-Menge sinkt (Abb.3.25).

Zum besseren Vergleich der bestimmten Zytokintranskripte mit der im Kulturüberstand nachgewiesenen Zytokinkonzentration, wurden Graphen beider Nachweismethoden (RT-PCR und ELISA) nebeneinander in den Abbildungen 3.29 und 3.30 dargestellt. Verglichen wurden die Transkriptwerte nach 3 h PAMP-Stimulierung mit Zytokinkonzentration im Kulturüberstand nach 6 h PAMP-Stimulierung (Abb. 3.24) sowie Transkriptwerte nach 6 h PAMP-Stimulierung mit Zytokinkonzentrationen im Überstand nach 24 h PAMP-Stimulierung (Abb. 3.25).

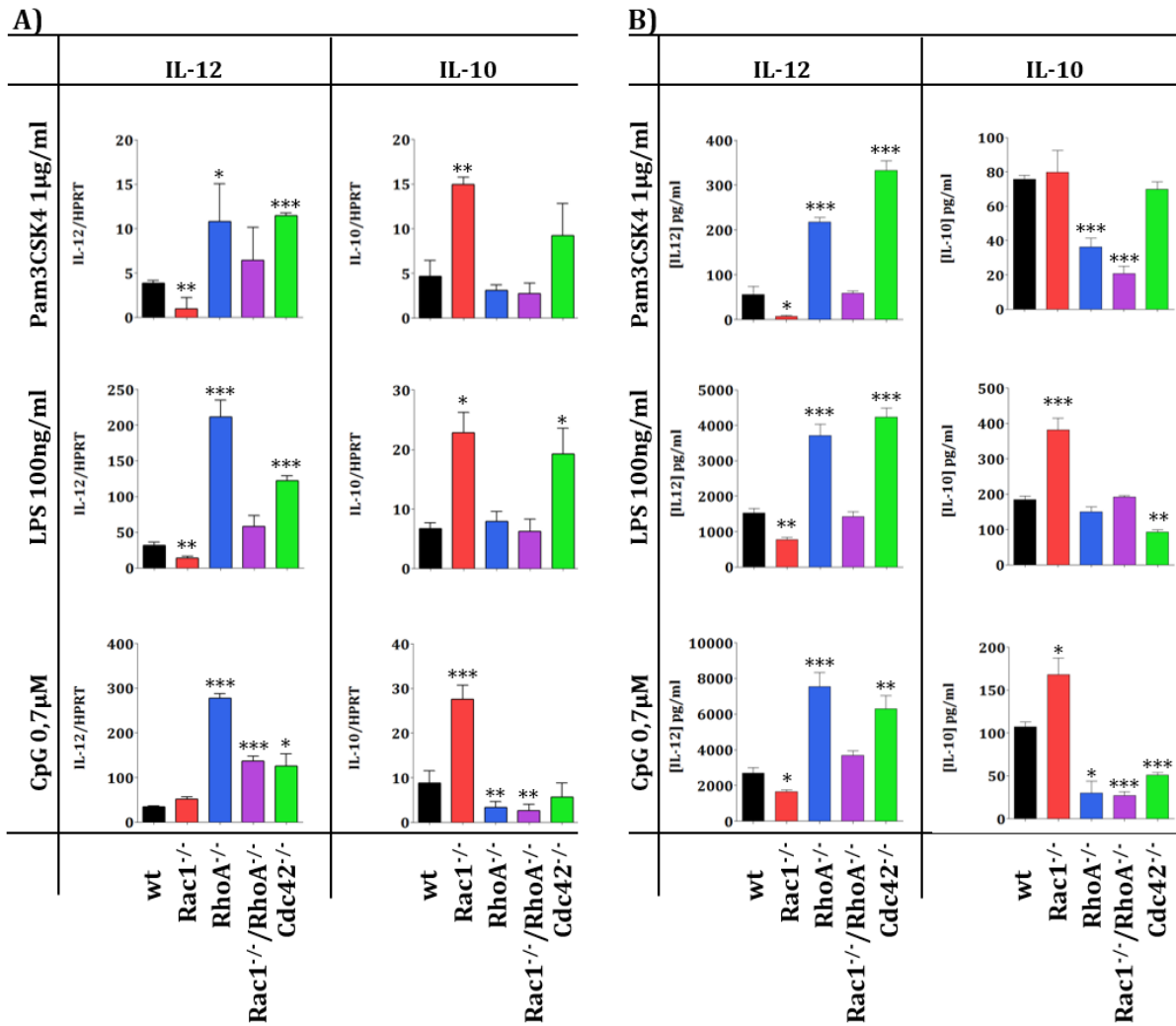


Abb.3.24 A): Ratiometrische Darstellung der qRT-PCR/qRT-PCR (HPRT) Transkriptwerte für IL-12/HPRT und IL-10/HPRT Transkripte (PAMP-Stimulierung für 3 h). **B):** Zytokinbestimmung im Kulturüberstand zum Vergleich (PAMP-Stimulierung für 6 h). A): Für die ratiometrische Zytokintranskriptbestimmung wurden 3×10^5 M-MΦ pro Vertiefung einer 12-well Platte ausgesät und in Duplika für 3 h mit TLR-Agonisten in einem Volumen von 300 µl stimuliert (dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung). Anschließend erfolgte die Zellyse mittels Trizol sowie die RNA Extraktion nach Trizol-Herstellerangaben. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben, die als Template für die qRT-PCR diente. B): Zum Vergleich die mittels ELISA bestimmten Konzentrationen in Zellkulturüberständen aus Abb 3.18 nach PAMP-Stimulierung für 6 h. Referenzgen: HPRT: (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$. Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die Kontrollmakrophagen M-MΦ(wt). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. wt (Kontrolle): M-MΦ(LysMCre), Rac1^{-/-}, RhoA^{-/-}, Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-} bzw. Cdc42^{-/-}: M-MΦ mit LysMCre-vermittelter Deletion der jeweiligen GTPase-Gene Rac1, RhoA, Rac1/RhoA und Cdc42.

Obwohl die Zytokintranskriptmuster von M-MΦ(Rac1^{-/-}) und M-MΦ(RhoA^{-/-}) hinsichtlich IL-12 und IL-10 den Zytokinkonzentrationen im Überstand von M-MΦ(Rac1^{-/-}) und M-MΦ(RhoA^{-/-}) ähneln, konnten Diskrepanzen bei M-MΦ(Cdc42^{-/-}) Zytokintranskripten verglichen mit Konzentrationen im Überstand (TLR4) festgestellt werden. Diese könnten durch posttranslationale Modifikationen verursacht worden sein.

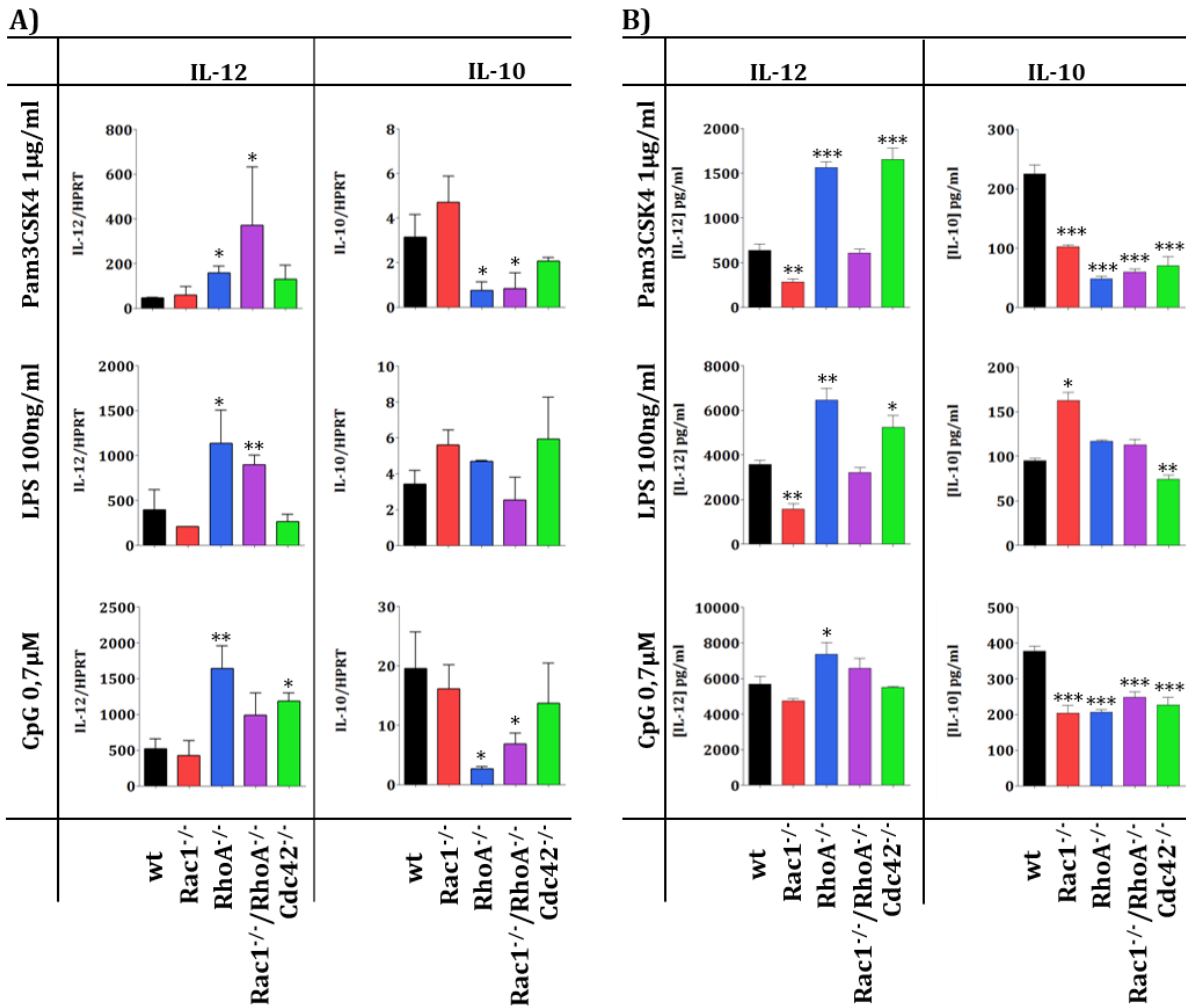


Abb.3.25 A): Ratiometrische Darstellung der qRT-PCR/qRT-PCR (HPRT) Transkriptwerte für IL-12/HPRT und IL-10/HPRT (PAMP-Stimulierung für 6 h). B): Zytokinbestimmung im Kulturüberstand zum Vergleich (24 h PAMP-Stimulierung). A): Für die ratiometrische Zytokintranskriptbestimmung wurden 3×10^5 M-MΦ pro Vertiefung einer 12-well Platte ausgesät und in Duplika für 6 h mit TLR-Agonisten in einem Volumen von 300 µl stimuliert (dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung). Anschließend erfolgte die Zellyse mittels Trizol sowie die RNA Extraktion nach Trizol-Herstellerangaben. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben, die als Template für die qRT-PCR diente. B): Zum Vergleich die mittels ELISA bestimmten Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen (Mittelwert von Tripliaka und Standardabweichung) (siehe Abb. 3.19). Referenzgen: HPRT: (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$. Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die Kontrollmakrophagen M-MΦ(wt). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. wt (Kontrolle): M-MΦ(LysMCre), Rac1^{-/-}, RhoA^{-/-}, Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-} bzw. Cdc42^{-/-}: M-MΦ mit LysMCre-vermittelter Deletion der jeweiligen GTPase-Gene *Rac1*, *RhoA*, *Rac1/RhoA* und *Cdc42*.

3.6.2 Ratiometrische Zytokintranskriptbestimmung in GM-MΦ

Wie unter 3.6.1 für M-MΦ beschrieben, wurden auch ratiometrische Bestimmungen für IL-12- und IL-10-Transkripte für GM-MΦ durchgeführt. Hierfür wurde GM-MΦ für 6 h mit 100 ng/ml LPS-stimuliert. Es wurden höhere ratiometrische Transkriptwerte für IL-12 und IL-10 in GM-MΦ(Rac1^{-/-}) im Vergleich zu den GM-MΦ(wt) nachgewiesen. Die IL-12 mRNA-Werte von GM-MΦ(RhoA^{-/-}) und GM-MΦ(Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-}) entsprechen denen von GM-MΦ(wt), wogegen die

relativen IL-10 Transkriptwerte deutlich unterhalb des Wertes von GM-MΦ(wt) sind. Die relativen IL-10-Transkriptwerte zwischen GM-MΦ(*Cdc42*^{-/-}) und GM-MΦ(wt) sind sehr ähnlich (Abb.3.26). Wie in Abb. 3.24 und 3.25 dargestellt, wurden zum Vergleich die relativen Zytokintranskripte den im Kulturüberstand nachgewiesenen Zytokinkonzentrationen gegenübergestellt (Abb. 3.26 rechts). Auch in den GM-MΦ(*Cdc42*^{-/-}) ist die Diskrepanz zwischen Zytokintranskripten und Konzentrationen im Überstand feststellbar. Diese könnten dadurch begründet sein, dass nur wenige Zellen Zytokine produzieren, die Transkriptmenge aber über alle Zellen bestimmt wird.

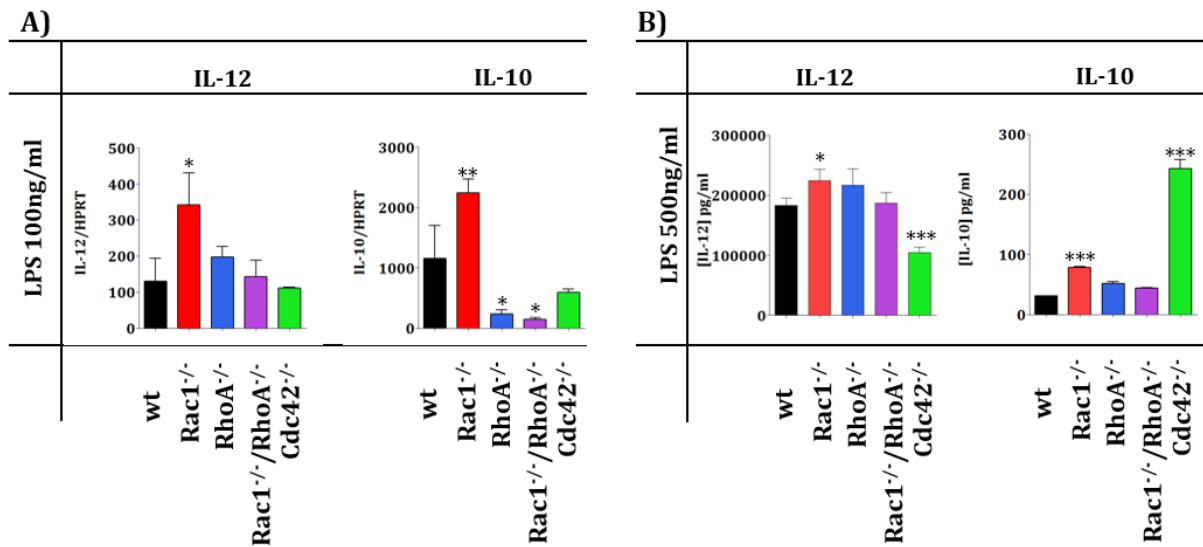


Abb.3.26: Ratiometrische Darstellung der qRT-PCR/qRT-PCR (HPRT) Transkriptwerte für IL-12/HPRT und IL-10/HPRT (PAMP-Stimulierung für 6 h). B): Zytokinbestimmung im Kulturüberstand zum Vergleich (PAMP-Stimulierung 24 h). A): Für die ratiometrische Zytokintranskriptbestimmung wurden 2×10^5 GM-MΦ pro Vertiefung einer 12-well Platte ausgesät und in Duplika für 6 h mit LPS in einem Volumen von 300 μ l stimuliert (dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung). Anschließend erfolgte die Zellyse mittels Trizol sowie die RNA Extraktion nach Trizol-Herstellerangaben. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben, die als Template für die qRT-PCR diente. B): Zum Vergleich die mittels ELISA bestimmten Konzentrationen in Zellkulturüberständen aus Abb. 3.21 nach PAMP-Stimulierung für 24 h. (Mittelwert von Tripliqa und Standardabweichung). Referenzen: HPRT: (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) Signifikanz: *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$. Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die Kontrollmakrophagen GM-MΦ(wt). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. wt (Kontrolle): GM-MΦ(LysMCre), *Rac1*^{-/-}, *RhoA*^{-/-}, *Rac1*^{-/-}/*RhoA*^{-/-} bzw. *Cdc42*^{-/-}: GM-MΦ mit LysMCre-vermittelter Deletion der jeweiligen GTPase-Gene *Rac1*, *RhoA*, *Rac1/RhoA* und *Cdc42*.

Sowohl in Zellkulturüberständen, als auch in der Bestimmung von Zytokintranskripten zeigt sich hinsichtlich des Einflusses von Rho GTPasen auf TLR-Signalwege in M-MΦ oder GM-MΦ ein ähnlicher Zusammenhang: Die Rho GTPasen beeinflussen überwiegend die Transkription der Zytokine und weniger die Translation oder Sekretion.

3.7 Einfluss der Hemmung mit Rac1- und ROCK-Inhibitoren auf die PAMP-induzierte Zytokinfreisetzung

Die Aktivierung von Rho GTPasen (Austausch von GDP zu GTP) erfolgt über aktivierte Austauschfaktoren (GEFs), für die es Inhibitoren gibt: Für Rac-GEFs den Inhibitor NSC23766. Aktivierte Rho GTPasen aktivieren durch Bindung Effektorproteine. Für den RhoA-Effektor ROCK gibt es den Kinasehemmer Y-27632. Da in der Literatur bereits Ergebnisse zum Einfluss von Rac1 auf den TLR2-Signalweg bekannt sind, wobei der Inhibitor NSC23766 genutzt wurde (Schmeck *et al.*, 2006), sollte die Wirkung dieses Rac1-Hemmers bzw. des ROCK-Hemmers auf die Zytokinfreisetzung von M-M Φ (wt) und GM-M Φ (wt) nach PAMP-Stimulierung analysiert werden, um die Ergebnisse mit denen zu vergleichen, die mit den Rho GTPase-depletierten M-M Φ und GM-M Φ erzielt wurden. Ein Inhibitor für Cdc42 wurde nicht verwendet, da dieser als spezifischer Hemmer nicht verfügbar ist.

3.7.1 Hemmung von Rac1 und ROCK in M-M Φ

Durch die Hemmung von Rac1 durch den spezifischen Inhibitor NSC23766 (Präinkubation für 4h) in M-M Φ (wt) und anschließender Stimulierung von TLR2 oder TLR4 für 24 h konnten geringere IL-12- und erhöhte IL-10-Konzentrationen im Überstand nachgewiesen werden (Abb.3.27). Diese Ergebnisse ähneln denen der Zytokinmenge in Zellkulturüberständen in Abb. 3.19 von M-M(Rac1^{-/-}). Im Vergleich dazu führte auch die Hemmung von ROCK durch 4 h-Präinkubation in M-M Φ zu geringeren Mengen von IL-12 und erhöhten Mengen von IL-10 im Kulturüberstand, was unerwartet war, denn in der Bestimmung von Zytokinen in Zellkulturüberständen führte die RhoA Depletion zu einer verstärkten Sekretion von IL-12 und zu einer verminderten Sekretion von IL-10 für TLR2. Dagegen war nach TLR4-Stimulierung (24 h) die sezernierte IL-12-Menge erhöht und die IL-10-Menge unverändert bezogen auf die der M Φ (wt). Offensichtlich spielen neben ROCK noch andere RhoA-Effektoren eine regulative Rolle.

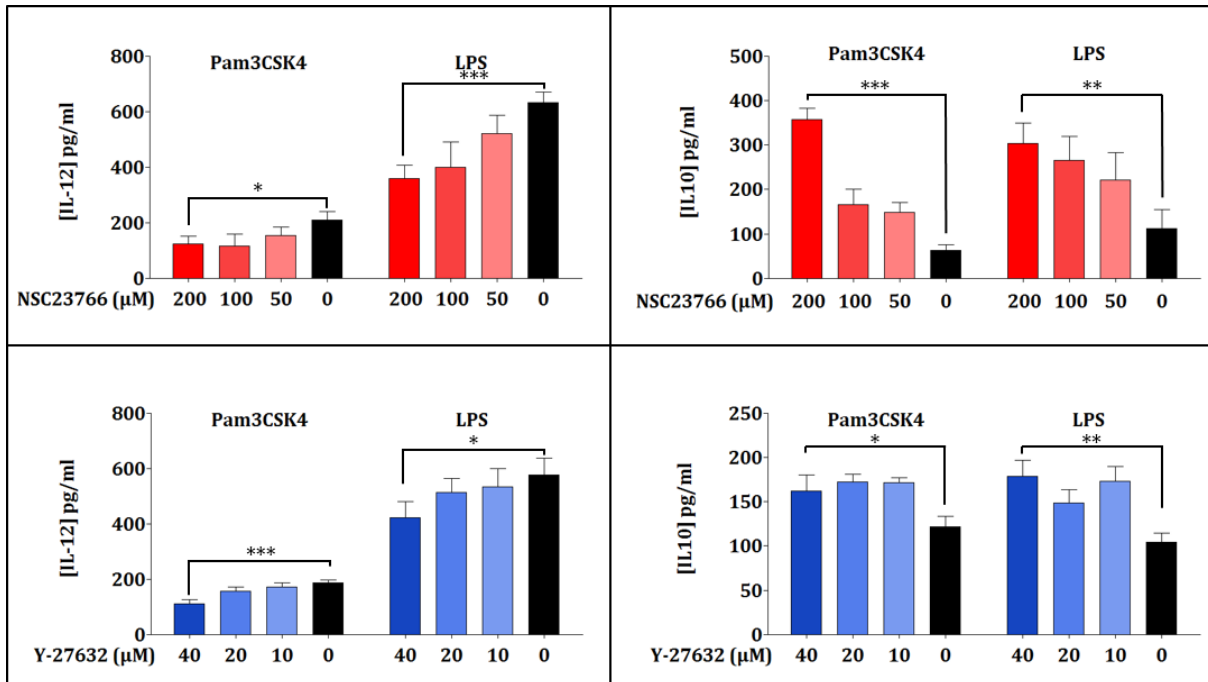


Abb.3.27: Hemmung von Rac1 und ROCK in M-MΦ(wt). Die Bestimmung der Konzentration sekretierter Zytokine nach Inkubation mit Rac1-Inhibitor (NSC23766) und ROCK-Inhibitor (Y-27632) in angegebenen Konzentrationen für 4 h und anschließender Stimulierung mit TLR-Agonisten für 24 h erfolgte mittels ELISA. Die Stimulierung erfolgte als 3-fach Bestimmung (dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung), wobei 2×10^5 M-MΦ pro Vertiefung einer 24-well Platte ausgesät wurden. Stimulierung in einem Volumen von 250 μ l. Signifikanzwerte: *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

3.7.2 Hemmung von Rac1 und ROCK in GM-MΦ

Wie in Abb 3.28 dargestellt führen Rac1- bzw. ROCK-Hemmung bei GM-MΦ (wt) nach PAMP-Stimulierung zu gleichen Effekten der Zytokinfreisetzung wie bei M-MΦ. Auch hier wurden sowohl nach Hemmung von Rac1-GEFs als auch nach Hemmung von ROCK geringere Mengen von IL-12 und erhöhte Mengen von IL-10 im Überstand detektiert (Abb.3.28). Wie mit M-MΦ zeigt sich auch hier ein anderes Zytokinmuster als erwartet. Beide Makrophagenarten verhalten sich nach Inkubation mit NSC23766 oder Y-27632 ähnlich. Diese Ergebnisse zeigen, dass Rac1- bzw. ROCK-Hemmversuche bei der TLR-Signaltransduktionsanalyse zu schwer interpretierbaren Ergebnissen führen.

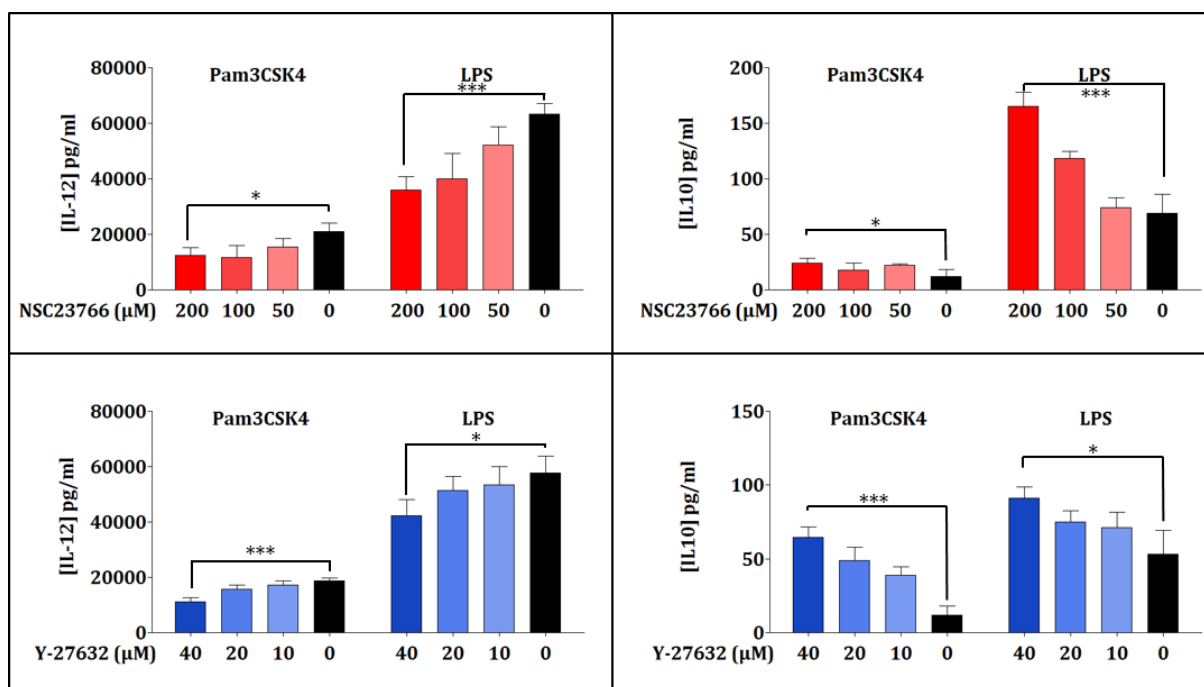


Abb.3.28: Hemmung von Rac1 und ROCK in GM-MΦ (wt). Die Bestimmung der Konzentration sekretierter Zytokine nach Inkubation mit Rac1-Inhibitor (NSC23766) und ROCK-Inhibitor (Y-27632) in angegebenen Konzentrationen für 4 h und anschließender Stimulierung mit TLR-Agonisten für 24 h erfolgte mittels ELISA. Die Stimulierung erfolgte als 3-fach Bestimmung (dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung), wobei 1×10^5 GM-MΦ pro Vertiefung einer 24-well Platte ausgesät wurden. Stimulierung in einem Volumen von 250 μ l. Signifikanzwerte: *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

3.8 Hemmung der PI3K

Es ist beschrieben worden, dass im TLR2-Signaltransduktionskomplex membranständige PI3K und Rac1 positiv beteiligt sind (Arbibe *et al.*, 2000). Allerdings wurden hitzeabgetötete Staphylokokken als TLR2-PAMP verwendet, was die TLR2-Spezifität einschränkt. Auch wurden keine primären Makrophagen verwendet. Inwieweit PI3K/Rac1 bei der Aktivierung anderer TLRs eine Rolle spielen, ist ebenso unklar. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass PI3K und Rac1 zur Abschwächung des NF κ B-Reportersignals beitragen. Der Einfluss des PI3K-Hemmers Wortmannin auf M-MΦ sollte untersucht werden.

3.8.1 Hemmung der PI3K in M-MΦ

Für diesen Versuch wurden M-MΦ mit 1 μ M Wortmannin für 1 h präinkubiert und dann mit 100 ng/ml LPS oder 1 μ g/ml Pam3CSK4 für 6 h inkubiert. Die quantitative Bestimmung der sekretierten Zytokine IL-12 und IL-10 wurde mittels ELISA bestimmt. Wie Abbildung 3.29 deutlich zeigt, führt die Wortmanninbehandlung zu einer Steigerung von IL-12 und zu einer Verminderung von IL-10.

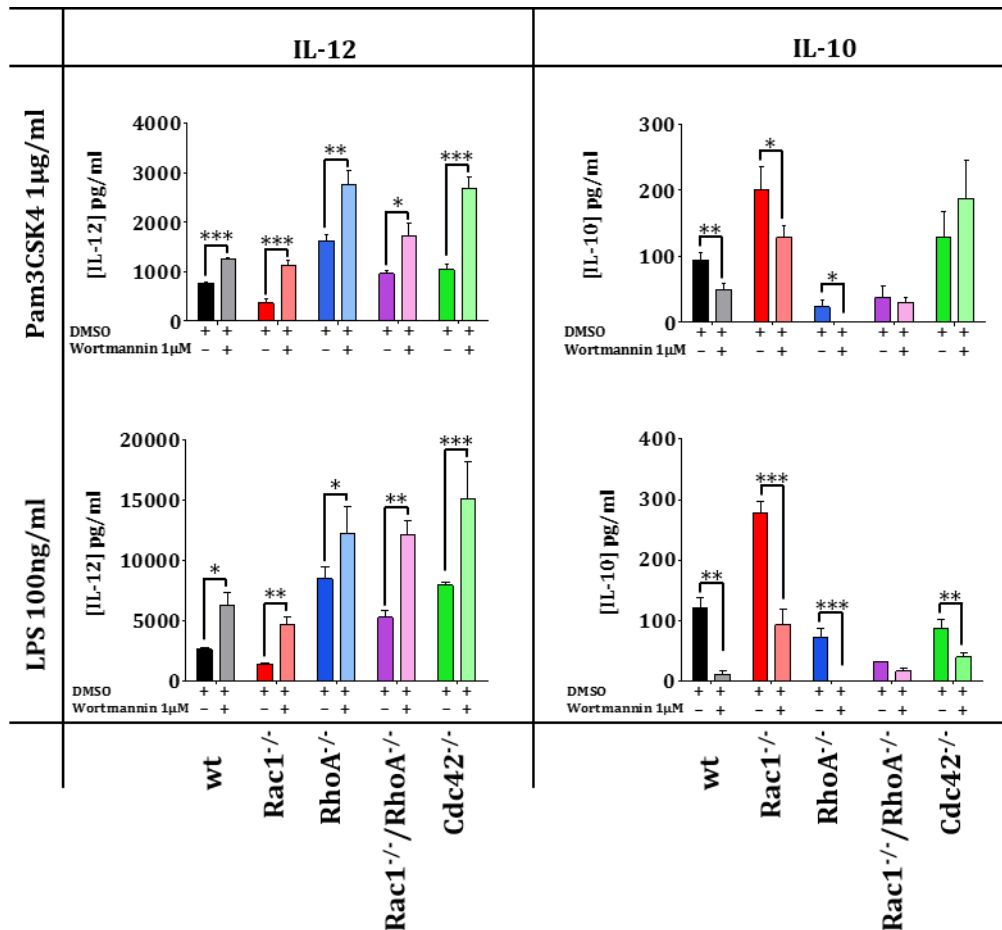


Abb.3.29: Zytokinbestimmung im Kulturüberstand von M-MΦ nach PI3K-Hemmung. Nach Vorinkubation mit Wortmannin (1 µM) für 1 h von M-MΦ und 6 h Stimulierung mit LPS oder Pam3CSK wurden im Kulturüberstand mittels ELISA IL-12 und IL-10 bestimmt. 3x10⁵ M-MΦ wurden pro Vertiefung einer 12-well Platte ausgesät und in Triplika zunächst für 1 h mit Wortmannin präinkubiert und dann für 6 h mit LPS und Pam3CSK4 in einem Volumen von 300 µl stimuliert (dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung). Anschließend erfolgte die Bestimmung der sekretierten Proteinmenge mittels ELISA. Signifikanzwerte: *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungen. wt (Kontrolle): M-MΦ(LysMCre), Rac1^{-/-}, RhoA^{-/-}, Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-} bzw. Cdc42^{-/-}: M-MΦ mit LysMCre-vermittelter Deletion der jeweiligen GTPase-Gene *Rac1*, *RhoA*, *Rac1/RhoA* und *Cdc42*.

3.9 Analyse der Signaltransduktionskaskade

Die TLR-Signaltransduktionskaskade wurde in den vergangenen Jahren intensiv untersucht (Akira *et al.*, 2000; Blasius and Beutler, 2009). Wichtige Schaltkomponenten sind die MAP-Kinasen, der Transkriptionsfaktor NFκB sowie die Kinase Akt oder GSK3β. Die Aktivierung dieser Komponenten kann durch die charakteristische Phosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten mittels Immunoblot und spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Diese Technik kam hier zur Anwendung. M-MΦ wurden 10 min, 20 min und 30 min nach Stimulierung mit TLR-Agonisten lysiert. In diesen Ganzzelllysaten wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Immunoblotanalyse mit spezifischen Antikörpern der Phosphorylierungsgrad der MAPK, NFκB (p65) und Akt bestimmt. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte M-MΦ. Erste präliminäre Daten zeigen, dass es nach Stimulierung mit Agonisten zum Anstieg von phosphoryliertem p65 (S536)

(Abb.3.30), Akt (S473), GSK3 β (S9) (Abb. 3.31), sowie der MAP-Kinasen ERK (T202/T204), JNK (T183/T185) und p38 (T180/T182) kommt (Abb.3.32). Das geschieht bereits 10 min nach der Stimulierung. Die verschiedenen Rho GTPase-depletierten M-M Φ zeigen nach Stimulierung keine Unterschiede im Phosphorylierungsgrad der MAP-Kinasen. Man kann allerdings eine stärkere Phosphorylierung von p65 bei M-M Φ (*Rac1*^{-/-}) im Vergleich zu M-M Φ (wt) feststellen. Im Gegensatz dazu ist p65 in M-M Φ (*RhoA*^{-/-}) nicht so stark phosphoryliert. P-Akt hingegen ist in M-M Φ (*Rac1*^{-/-}) weniger stark detektierbar als in M-M Φ (wt). Einen Unterschied in der Phosphorylierung von GSK3 β konnte nicht nachgewiesen werden.

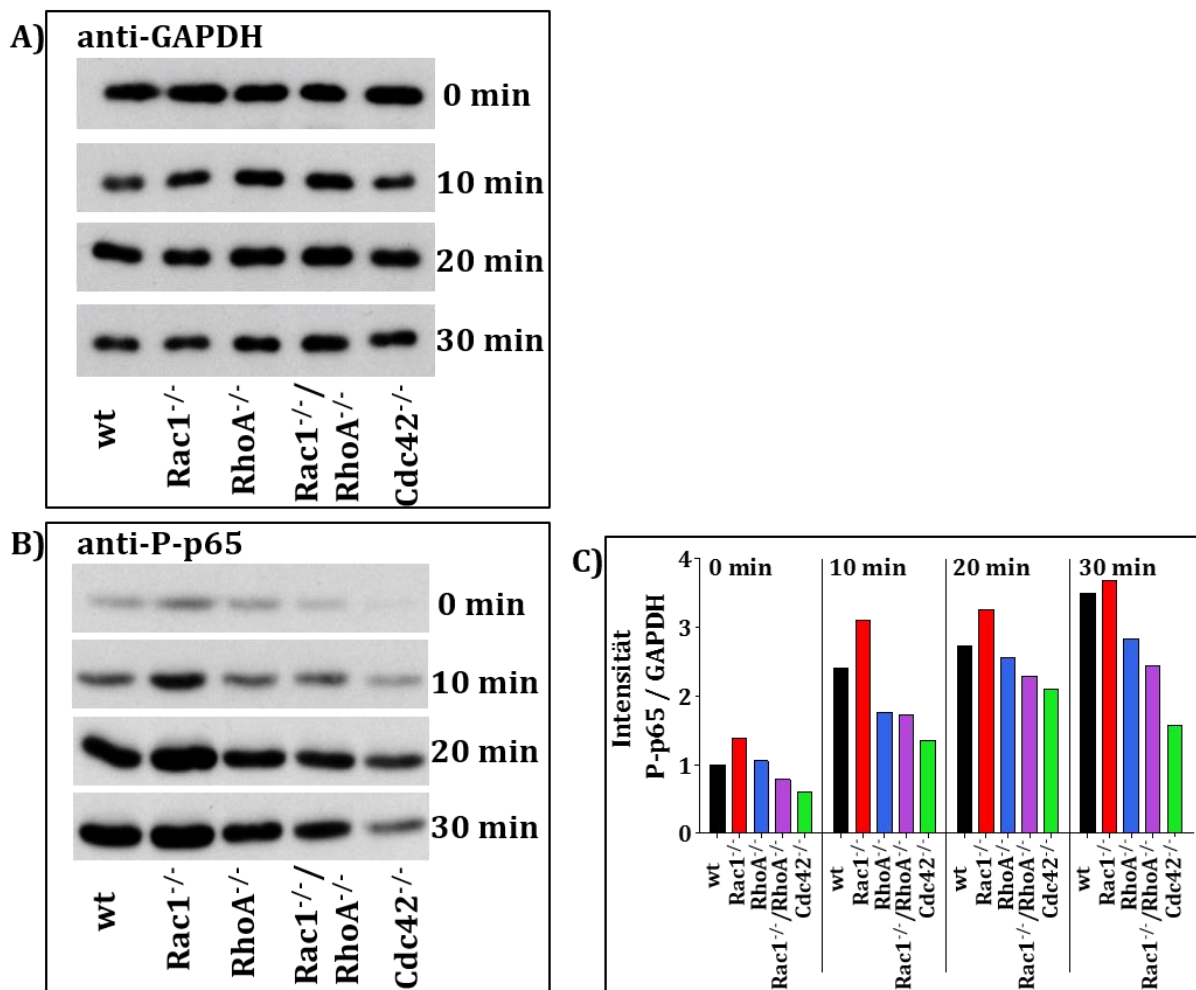


Abb. 3.30: Detektion von phosphoryliertem p65 durch spezifische Antikörper mittels Immunoblot und Darstellung der relativen Bandenintensität bezogen auf GAPDH (<http://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/2118>). M-M Φ wurden mit 100 ng/ml LPS-stimuliert und nach den angegebenen Inkubationszeiten (0 min, 10 min, 20 min, 30 min) lysiert. Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot hinsichtlich Phospho-p65 mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. A) Immunoblot zum Nachweis von GAPDH als Referenz für densitometrische Quantifizierung. B) Immunoblot zum Nachweis von Phospho-p65 (S536). C) Densitometrische Quantifizierung der Immunoblotbanden von A und B und ratiometrische Darstellung der relativen Werte wie angegeben. von Phospho-p65 bezogen auf GAPDH-Intensität in derselben Probe. wt (Kontrolle): M-M Φ (LysMCre), *Rac1*^{-/-}, *RhoA*^{-/-}, *Rac1*^{-/-}/*RhoA*^{-/-} bzw. *Cdc42*^{-/-}: M-M Φ mit LysMCre-vermittelter Deletion der jeweiligen GTPase-Gene *Rac1*, *RhoA*, *Rac1/RhoA* und *Cdc42*.

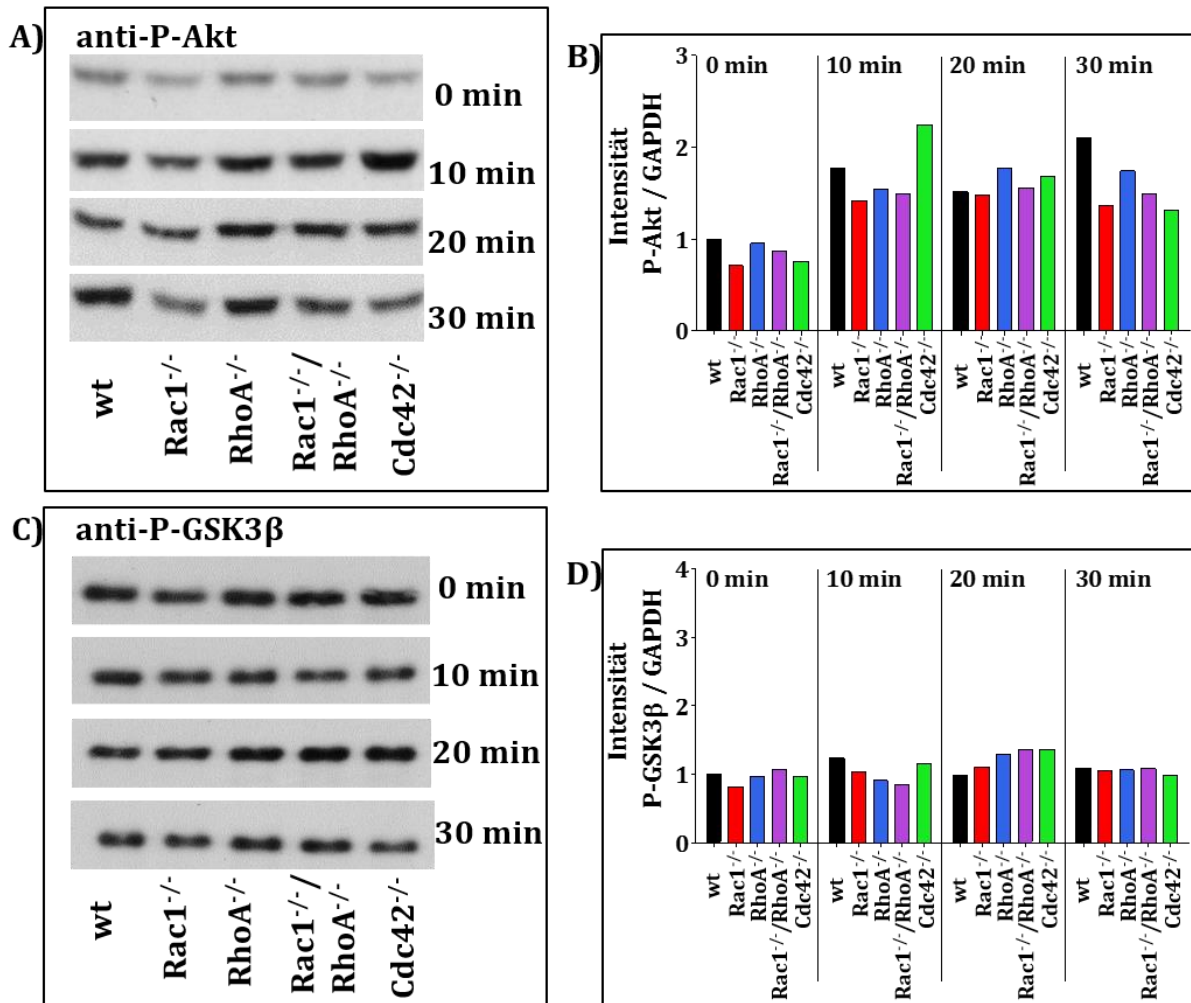


Abb. 3.31: Detektion von phosphoryliertem Akt und GSK3β durch spezifische Antikörper mittels Immunoblot und Darstellung ihrer relativen Bandenintensität bezogen auf GAPDH (s.Abb. 3.30). M-MΦ wurden mit 100 ng/ml LPS-stimuliert und nach den angegebenen Inkubationszeiten (0 min, 10 min, 20 min, 30 min) lysiert. Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot hinsichtlich phosphorylierter Proteine mit den entsprechenden phosphoproteinspezifischen Antikörpern analysiert. Densitometrische Quantifizierung der Immunoblotbanden von A, C und den Referenzbanden (GAPDH von Abb. 3.35 A mit ratiometrischer Darstellung für p-Akt (B) und p-GSK3β (D). wt (Kontrolle): M-MΦ(LysMCre), Rac1^{-/-}, RhoA^{-/-}, Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-} bzw. Cdc42^{-/-}: M-MΦ mit LysMCre-vermittelter Deletion der jeweiligen GTPase-Gene *Rac1*, *RhoA*, *Rac1/RhoA* und *Cdc42*.

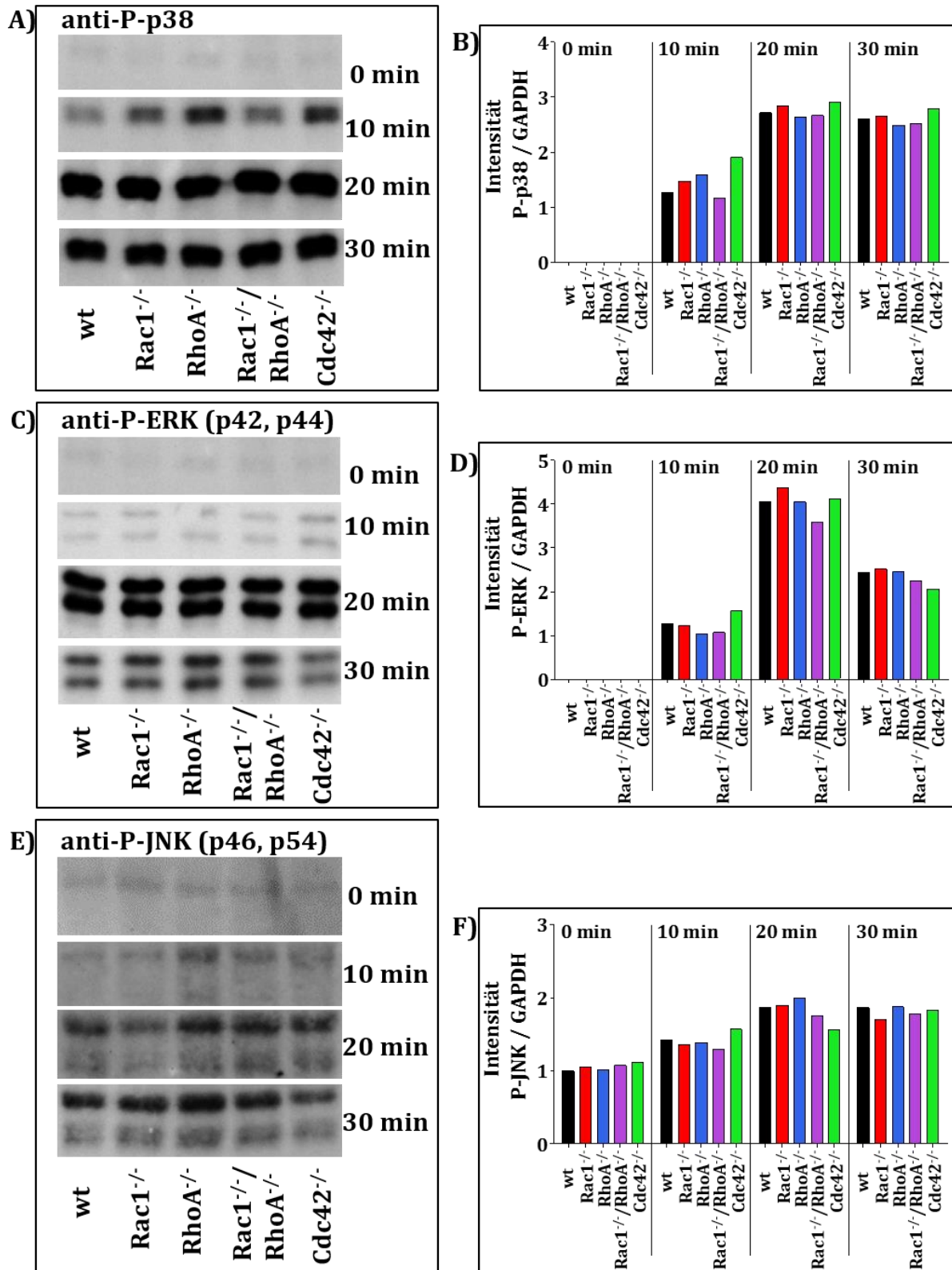


Abb. 3.32: Detektion von phosphoryliertem p38, ERK und JNK durch spezifische Antikörper mittels Immunoblot und Darstellung ihrer relativen Bandenintensität bezogen auf GAPDH (s. Abb. 3.30). M-MΦ wurden mit 100 ng/ml LPS-stimuliert und nach den angegebenen Inkubationszeiten (0 min, 10 min, 20 min, 30 min) lysiert. Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot hinsichtlich phosphorylierter Proteine mit den entsprechenden phosphoproteinspezifischen Antikörpern analysiert. Densitometrische Quantifizierung der Immunoblotbanden von A, C, E und den Referenzbanden (GAPDH von Abb. 3.35 A mit ratiometrischer Darstellung für p-Akt (B), p-GSK3β (D) und Phospho-JNK (F)). wt (Kontrolle): M-MΦ(LysMCre), *Rac1*^{-/-}, *RhoA*^{-/-}, *Rac1*^{-/-}/*RhoA*^{-/-} bzw. *Cdc42*^{-/-}: M-MΦ mit LysMCre-vermittelter Deletion der jeweiligen GTPase-Gene *Rac1*, *RhoA*, *Rac1*/*RhoA* und *Cdc42*.

4. Diskussion

Viele bakterieller Infektionserreger sezernieren sogenannte Moduline/Toxine, die die Funktion von zellulären GEFs oder GAPs nachahmen (Mimikri) oder die Aktivitäten von Rho GTPasen durch enzymatische Modifikation modulieren. Diese bakteriellen Moduline/Toxine können sezerniert und anschließend als Exotoxine von Wirtszellen aufgenommen werden oder direkt von Bakterien über Typ 3 Sekretionssysteme (T3SS) oder Typ 4 Sekretionssysteme (T4SS) in Wirtszellen injiziert werden. Dadurch sind die Erreger in der Lage, die Funktion von Rho GTPasen zu ihrem Vorteil zu beeinflussen (Heesemann *et al.*, 2006, Schlumberger and Hardt, 2006, Hicks and Galán, 2013, Lemichez and Aktories, 2013). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob Bakterien durch die Manipulation von Rho GTPasen ebenfalls in der Lage sind, Rezeptorsignalwege, an denen Rho GTPasen beteiligt sein können, zu beeinflussen, um z.B. die angeborene Immunantwort zu kontrollieren. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Gendelektionen von Rho GTPasen in primären Mausmakrophagen einen Einfluss auf die Zytokinproduktion in Folge einer PAMP-Stimulierung der Toll-Like Rezeptoren 2, 4 und 9 haben.

4.1 Rho GTPasen in TLR-Signalwegen und Methoden zu deren Untersuchung

Rho GTPasen sind an verschiedenen Rezeptorsignalkaskaden beteiligt (z.B. in der Entwicklung von Knorpel (Beier and Loeser, 2010) oder Wnt-Signalwege in Entwicklung und Gewebehomöostase (Schlessinger *et al.*, 2009)). Für die angeborene Immunität spielen Toll-Like Rezeptoren als spezifische Mustererkennungsrezeptoren für PAMPs und DAMPs eine wichtige Rolle. Zur Beteiligung von Rho GTPasen in TLR-Signalwegen sind in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse beschrieben, die wahrscheinlich im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Methoden und Zelltypen stehen. Tabelle 4.1 gibt eine Zusammenfassung.

Tab. 4.1: Zusammenfassung einiger wichtiger Ergebnisse zum Einfluss der Rho GTPasen auf die TLR-Signalwege.

Referenz	Hauptaussage	Verwendete Zellen/Zelllinien und methodische Besonderheiten
Arbibe <i>et al.</i> , 2000	TLR2-Stimulierung: Rac1 und PI3K notwendig für NFκB-Transaktivität, positive Regulation	THP-1, HEK293, Transfektion mit dn-Rac1, dn-p85, NFκB-Reporterstudien, PI3K-Inhibitor Wortmannin
Teusch <i>et al.</i> , 2004	TLR2-Stimulierung: RhoA und PKCζ notwendig für NFκB-Aktivität, positive Regulation, PI3K-unabhängig	THP-1, HEK293, Transfektion mit dn-RhoA, PI3K-Inhibitor Wortmannin
Chen <i>et al.</i> , 2002	TLR4-Stimulierung: RhoA- und IRAK-abhängig positive Regulation	humane periphere Blutmonozyten, THP-1, HEK293, Transfektion mit dn-RhoA, RhoA-Inhibitor C3 Transferase Exoenzym
Equils <i>et al.</i> , 2004	TLR4-Stimulierung: Rac1-abhängig positive Regulation	HMEC, Transfektion mit dn- und ka-Rac1,
Monick <i>et al.</i> , 2003	TLR2-, TLR4-, TLR9-Stimulierung: Rho GTPasen wirken als negative Regulatoren	RAW 264.7, Rho GTPase Prenylierungsinhibitor Lovastatin
Borysiewicz <i>et al.</i> , 2009	TLR2-, TLR3-, TLR4-Stimulierung: Rho GTPasen wirken als negative Regulatoren	Astrozyten, RhoA/Rac1/Cdc42-Inhibitor <i>Clostridium difficile</i> Toxin B

Zum einen wurde gezeigt, dass sowohl Rac1 als auch RhoA notwendig sind für ein starkes TLR-vermitteltes Signal, zum anderen wurde gezeigt, dass bei einer Hemmung von Rho GTPasen eine Erhöhung der sekretierten Zytokine zu beobachten ist. Eine Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse kann einerseits auf die unterschiedlichen verwendeten Zelllinien (z.B. HEK293 vs. RAW 264.7) andererseits auf unterschiedliche Regulation der Rho GTPasen in verschiedenen Zellarten zurückzuführen sein (Ruse and Knaus, 2006). Des Weiteren ist die Verwendung von dominant negativen (dn) oder konstitutiv aktiven (ka) Rho GTPasen mit Artefakten verbunden (Wang and Zheng, 2007). Die dn Rho GTPasen binden und sequestrieren die entsprechenden GEFs, was damit kompetitiv zur verminderten Aktivierbarkeit von anderen Mitgliedern der Rho GTPase Familie führt (Williams *et al.*, 2000). Daher müssen dn Rho GTPase überexprimiert werden (Smits *et al.*, 2010). In ka Rho GTPasen sind Aminosäuren, die wichtig sind für die GTP-Hydrolyse, ausgetauscht (Ridley, 2000). Dadurch bleibt GTP an die ka Rho GTPasen dauerhaft gebunden, wodurch angeschaltete Signalwege nicht inaktiviert werden (Ridley, 2000). Um das endogene Rho GTPase-Netzwerk weniger zu stören und spezifische oder überlappende Funktionen der jeweiligen Rho GTPasen zu ermitteln, können genetisch manipulierte Mäuse oder ihre primären Zellen genutzt werden (Wang and Zheng, 2007). Die Gendeletion von *RhoA*, *Rac1* und *Cdc42* von embryonalen Mausstammzellen führt nicht zu lebensfähigen Mäusen (Wang und Zheng, 2007,

Chen *et al.*, 2000, Sugihara *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden durch Mauskreuzungen (LysMCre x Rho GTPase^{fl/fl}) makrophagenspezifische *RhoA*, *Rac1* und *Cdc42* Gendelektionen (LysMCre RhoA^{fl/fl}, LysMCre Rac1^{fl/fl}, LysMCre Cdc42^{fl/fl} sowie LysMCre Rac1^{fl/fl}/RhoA^{fl/fl} in Knochenmarkmakrophagen erzeugt. Da Yersinien in der Lage sind, die Rho GTPasen durch das Einbringen von Virulenzfaktoren z.B. YopE und YopT zu modulieren, sollten die Rho GTPase-deletierten MΦ als Zellinfektionsmodell genutzt werden, um zu überprüfen, welchen Einfluss die Deletion von *RhoA*, *Rac1* oder *Cdc42* auf das TLR-induzierte Zytokinsekretionsmuster dieser Phagozyten hat. Die erzielten Ergebnisse könnten zu einem besseren Verständnis beitragen, wie Yersinien das Zytokinmuster und damit das Immunsystem durch Modulierung von Rho GTPasen beeinflussen können. Soweit bekannt, ist nur die LysMCre Rac1^{fl/fl} Maus in der Literatur hinsichtlich Neutrophilenmigration und ROI-Bildung beschrieben (Glogauer *et al.*, 2003). Makrophagen mit Rac1-Depletion wurde jedoch nicht im Zusammenhang mit dem TLR-Signalweg untersucht.

4.2 Aktivität des LysM-Promotors in M-MΦ und GM-MΦ

Zellen mit Cre-vermittelter Deletion von Genen stellen ein wichtiges biologisches Werkzeug dar, um biologische Fragestellungen in der Maus zellspezifisch zu untersuchen. Um die Bedingungen für eine hohe LysMCre-Expression zu bestimmen und damit die Bedingungen für die Deletion der „geflochten“ Gene der Rho GTPasen zu optimieren, wurden zunächst KMZ von LysM-eGFP Mäusen als LysM-Surrogatreporter isoliert und nach zwei Methoden kultiviert: 1) in M-CSF-Medium und 2) in GM-CSF-Medium. Dabei werden KMZ entweder mit M-CSF inkubiert, wodurch M-MΦ generiert werden oder mit GM-CSF, wodurch es zur Bildung von GM-MΦ kommt. In beiden Makrophagenarten sollte der LysM-Promotor aktiv sein und in LysMCre GTPase^{fl/fl} zur Deletion der „geflochten“ GTPase-Gene führen. Diese Annahme der LysM-Promotoraktivität wurde bestätigt, denn es konnte gezeigt werden, dass differenzierte LysM-eGFP-MΦ zu nahezu 100% GFP-positiv sind. Die Depletionen der jeweiligen GTPasen konnte in den LysMCre GTPase^{fl/fl} Makrophagen mittels Immunoblot nachgewiesen werden. Obwohl jedoch nahezu 100% der M-MΦ bzw. GM-MΦ GFP-positiv sind, konnten in fast allen LysMCre GTPase^{fl/fl} MΦ die jeweiligen GTPase in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden (inkomplette GTPase-Depletion, < 5 %), was auch andere Arbeiten beschreiben (Clausen *et al.*, 1999 und Ohtani *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde überprüft, ob es sich bei den differenzierten MΦ um Mischpopulationen handelt (unterschiedliche Differenzierungsgrade von Makrophagen und ggf. DCs), da z.B. der charakteristische Makrophagenmarker F4/80 im Fall von M-MΦ nur bei 80% der Zellen und im Fall von GM-MΦ nur bei 40% der Zellen positiv war. Durch einen weiteren Reinigungsschritt und Sortierung der Zellen durch spezifische Antikörper nach der Differenzierung könnten Subzelltypen voneinander getrennt und hinsicht-

lich der GTPase-Depletion näher charakterisiert werden. Dieser Reinigungsschritt wäre von Vorteil, da sich mögliche Subzelltypen auch hinsichtlich der Stimulierung mit TLR-Agonisten unterschiedlich verhalten könnten. Andererseits könnte eine Zellreinigung die Zellen präaktivieren und so die TLR-Signalwege modifizieren und damit einen sinnvollen Vergleich der Ergebnisse erschweren. Auf eine Sortierung von Zellen wurde deshalb verzichtet.

Populationen von *in vitro* generierten Makrophagen und Dendritischen Zellen (DCs aus KMZ) werden in der Literatur kontrovers diskutiert. *In vivo* unterscheidet man Makrophagen je nach Art der Aktivierung als klassisch (M1) oder alternativ (M2) aktivierte Makrophagen. *In vitro* können Makrophagen aus KMZ mit M1-ähnlichen Eigenschaften durch die Differenzierung mit GM-CSF und Makrophagen mit M2-ähnlichen Eigenschaften durch die Inkubation mit M-CSF generiert werden (Lacey *et al.*, 2012). Dabei unterscheidet sich das Protokoll zur *in vitro* Generierung von DCs mit GM-CSF nicht wesentlich von dem zur Kultivierung von M1-ähnlichen Makrophagen (Inaba *et al.*, 2009, Lutz *et al.*, 1999) und auch die sogenannten M1-ähnlichen Makrophagen haben überlappende Eigenschaften und Oberflächenmarker von unreifen DCs (Inaba *et al.*, 1992, Fleetwood *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch den typischen Makrophagen-/Neutrophilenpromotor LysM nicht nur die M-M Φ sondern auch GM-M Φ LysM-GFP-positiv sind. Die LysM-GFP-positiven GM-M Φ sollten aufgrund der LysM-Aktivität typische Makrophagen und weniger DC-ähnliche Zellen sein, was im Widerspruch zu früher publizierten Arbeiten steht (Lutz *et al.*, 1999). Des Weiteren ist beschrieben, dass es kaum einen Unterschied in der Oberflächenmarkerexpression von GM-M Φ und den als DCs bezeichneten Zellen gibt (Li and Lu, 2010). Aufgrund ihrer Oberflächenmarker und der nahezu 100%igen Expression von LysM-eGFP in den hier generierten Knochenmarkmakrophagen kann man davon ausgehen, dass es sich bei den differenzierten M-M Φ um eine relativ homogene M2-ähnliche M Φ -Population handelt und bei den GM-M Φ um M1-ähnliche M Φ mit geringem Anteil (10-15%) von DC-ähnlichen Zellen (LysM-GFP-negativ).

In einem zweiten Ansatz wurde versucht, Knochenmarkzellen zu immortalisieren, um die Reproduzierbarkeit der Experimente zu verbessern. Es wurden Mausknorpelmarkzellen aus LysMCre Kontrollmäusen (wt), LysMCre Rac1^{fl/fl} sowie LysMCre RhoA^{fl/fl}, die durch Transfektion mit dem HoxB8-Retrovirus immortalisiert wurden, durch Zugabe von GM-CSF zu immortalisierten Makrophagen (GM-iM Φ) differenziert (Wang *et al.*, 2006). Bei der Immortalisierung wurde eine Fusion des zytosolischen HoxB8 mit dem Östrogenrezeptor genutzt, um durch Zugabe von Östrogen die Differenzierung von immortalisierten Zellen zu verhindern. Durch Inkubation der Vorläuferzellen mit Östrogen und GM-CSF kommt es nach Östrogenentzug und weiterer Stimulierung mit GM-CSF zur Generierung von Makrophagen. Die so erhaltenen GM-iM Φ (wt), GM-iM Φ (Rac1^{-/-}) sowie GM-iM Φ (RhoA^{-/-}) wurden hinsichtlich der jeweiligen LysMCre-abhängigen GTPase-Depletion mittels Immunoblotanalyse untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Immortalisierung

keinen Einfluss auf die Aktivität der Cre-Rekombinase hat und es auch in den immortalisierten GM-iM Φ zur Depletion der jeweiligen GTPase kommt (S. 75, Abb. 3.22). Des Weiteren ähnelt sich das Wachstumsverhalten der primären GM-M Φ und der immortalisierten GM-iM Φ , die beide als Mischung von Suspensionszellen und adhärenente Zellen vorliegen. Werden immortalisierte GM-iM Φ (wt), GM-iM Φ (Rac1 $^{-/-}$) sowie GM-iM Φ (RhoA $^{-/-}$) mit Agonisten für TLR2 bzw TLR4 stimuliert, kommt es zur Sekretion von Zytokinen. Dabei ähnelt das IL-12-Sekretionsmuster von immortalisierten GM-iM Φ dem der primären GM-M Φ (S. 76 Abb. 3.23). Durch die Depletion von Rac1 kommt es zu stärkerer Sekretion von IL-12 in den Kulturüberstand. Für das TNF α -Sekretionsmuster konnte jedoch keine Übereinstimmung festgestellt werden. Tendenziell sezernieren primäre GM-M Φ (Rac1 $^{-/-}$) geringere Mengen TNF α und GM-M Φ (RhoA $^{-/-}$) verstärkt TNF α in den Überstand. Die immortalisierten GM-iM Φ (Rac1 $^{-/-}$) sezernieren hingegen verstärkt TNF α , wobei die GM-iM Φ (RhoA $^{-/-}$) etwa gleiche Mengen TNF α sezernieren wie die GM-iM Φ (wt) (S. 76, Abb 3.23). Dieses unterschiedliche Zytokinmuster könnte durch die Stimulierung mit den Zytokinen IL-3 sowie IL-6 während der Immortalisierung begründet sein, durch die es zu einer Überlagerung von intrazellulären Signalwegen kommen könnte. Untersuchungen von Rosas *et al.* zeigen, dass HoxB8-immortalisierte Makrophagenvorläuferzellen (M Φ P= HoxB8-GM-CSF-Vorläuferzellen) nach GM-CSF Stimulierung den GM-CSF kultivierten aus Knochenmark generierten Dendritischen Zellen (BMDC) ähneln (Rosas *et al.*, 2011). Die BMDCs wurden auf ähnliche Art differenziert, wie die primären GM-M Φ in der vorliegenden Arbeit. Zusammenfassend wurde beschrieben, dass die HoxB8-immortalisierten M Φ P nach GM-CSF Stimulierung den primären BMDC hinsichtlich Oberflächenmarker, Wachstumsverhalten sowie Zytokinsekretionsprofil ähneln (Rosas *et al.*, 2011). Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Sekretion von Zytokinen zeigen, dass sich die GTPase-depletierten immortalisierten GM-iM Φ von primären GM-M Φ unterscheiden. Daher wurden keine weiteren Versuche zum Einfluss der Rho GTPasen in TLR-Signalwegen mit den immortalisierten KMZ durchgeführt.

4.3 Vergleich der PAMP/TLR-Antwort von M-M Φ mit der von GM-M Φ

Um den Einfluss von Rho GTPasen in TLR-Signalwegen zu untersuchen, wurden Makrophagen mit spezifischen Agonisten für die Toll-Like Rezeptoren 2, 4 und 9 stimuliert. Dabei sind TLR2 und TLR4 auf der Zelloberfläche exponiert, TLR9 ist dagegen im Endosom lokalisiert (S. 14, Abb. 1.4). Die TLR2- und TLR9-abhängige Signalkaskade wird über MyD88 vermittelt. Hierzu ist eine Abhängigkeit von Rac1 an der TLR2-vermittelten Signalkaskade in HEK293 Zellen (Nierenepithellinlinie) sowie THP-1 Zellen (Makrophagenlinie) bereits beschrieben worden (Arbibe *et al.*, 2000). Die TLR4-vermittelten Signalwege sind MyD88-abhängig und Trif-abhängig. Durch die Bindung von LPS an den TLR4/MD-2/CD14-Komplex kommt es zunächst zur Aktivierung der

MyD88-abhängigen Signalwege und anschließend durch die Internalisierung des Rezeptors zur Aktivierung der Trif-abhängigen Signalkaskade (Kawai and Akira, 2010). TLR2, TLR4 und TLR9 unterscheiden sich also hinsichtlich ihrer Lokalisation (Zytoplasmamembran, Endosomenmembran) sowie ihrer Signalkaskaden: TLR2 ist MyD88- und Tirap-abhängig, TLR4 ist MyD88- und Tirap- sowie Trif- und Tram-abhängig, TLR9 ist MyD88-abhängig (S. 14, Abb. 1.4). *In vivo* unterscheidet man proinflammatorische M1 Makrophagen und antiinflammatorische M2 Makrophagen. Dabei ähneln die GM-M Φ den als M1 Makrophagen bezeichneten Zellen hinsichtlich ihres Zytokinsekretionsmusters. Nach Stimulierung mit PAMPs kommt es nach 6 h zu einer starken Ausschüttung von IL-12 und zu einer sehr geringen Sekretion von IL-10, also einer proinflammatorischen Antwort. Im Vergleich dazu ähnelt das Zytokinsekretionsmuster von M-M Φ dem der M2 Makrophagen, die nach Aktivierung bereits nach frühen Zeitpunkten (6 h) verstärkt antiinflammatorisches IL-10 sekretieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen klar, dass Rho GTPase-Gendeletionen Auswirkungen auf die Zytokinsekretion in PAMP/TLR-stimulierten primären Knochenmarkmakrophagen haben. Dabei führt die Gendeletion von Rac1 in M-M Φ , die für 6 h mit Agonisten für TLR2 (Pam3CSK4), für TLR4 (LPS) sowie für TLR9 (CpG) stimuliert wurden, zur verminderten Expression von IL-12 und nach Aktivierung von TLR4 und TLR9 zu verstärkter Freisetzung von IL-10 im Vergleich zu M Φ (wt). Bei TLR2-aktivierten M-M Φ (Rac1^{-/-}) ist die verstärkte Sekretion von IL-10 nicht so stark ausgeprägt wie in TLR4- oder TLR9-aktivierten M-M Φ (Rac1^{-/-}). Tendenziell führt die Depletion von Rac1 in M-M Φ zu verminderter IL-12- und gesteigerter IL-10-Sekretion, was auch durch Bestimmung der Zytokintranskripte gezeigt wurde (S. 70, Abb. 3.18 sowie S. 78, Abb. 3.24). Das gilt für die Stimulierung mit Agonisten für TLR2, TLR4 sowie TLR9 und ist damit unabhängig von der TLR-Lokalisation. In GM-M Φ (Rac1^{-/-}) kommt es nach Pam3CSK4- und CpG-Stimulierung zur verstärkten Sekretion von IL-12 nach 6 h. Tendenziell konnte die gesteigerte Sekretion auch nach Stimulierung mit LPS festgestellt werden (S. 73, Abb. 3.20). Nach 24 stündiger Stimulierung mit Agonisten für TLRs 2, 4 und 9 wurde in GM-M Φ (Rac1^{-/-}) im Vergleich mit GM-M Φ (wt) auch eine gesteigerte Expression von IL-10 festgestellt, was zu diesem späten Zeitpunkt als sekundärer Effekt durch die verstärkte Sekretion von IL-12 gewertet werden könnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Depletion von Rac1 hinsichtlich M-M Φ und GM-M Φ nach PAMP-Stimulierung unterschiedliche Auswirkungen hat. Da es sich bei den GM-M Φ bezüglich des F4/80 Markers (nur 40% der Zellen sind F4/80 positiv) um eine Mischpopulation handelt, kann angenommen werden, dass die F4/80 positive Population nach PAMP-Stimulierung ein anderes Zytokinsekretionsmuster aufweist als die F4/80-negative Population und sich Zytokinprofile von F4/80-positiver und -negativer Population überlagern. Daher wurde der Effekt der GTPase-Gendeletion auf PAMP-aktivierte GM-M Φ nicht weiter untersucht.

Interessanterweise konnte bei TLR2-, TLR4- und TLR9- aktivierten M-M Φ (Rac1^{-/-}) und M-M Φ (RhoA^{-/-}) ein inverses IL-12/IL-10 Zytokinprofil festgestellt werden: *RhoA*-Deletion führte

in PAMP-stimulierten M-M Φ zu starker Sekretion von IL-12 und zu schwacher Sekretion von IL-10, im Vergleich dazu zeigten M-M Φ (Rac1^{-/-}) eine schwächere IL-12-Sekretion und eine stärkere IL-10-Produktion. Das Konzept „Rac1/RhoA als Regulatoren für gegensätzliche Prozesse (= Gegenspieler)“ wurde bereits bezogen auf das Zytoskelett beschrieben (Iden and Collard, 2008). Die Gegenspielereigenschaften von Rac1 und RhoA können von GEFs und GAPs vermittelt werden. In hämatopoetischen Zellen, zu denen Makrophagen gehören, konnten als GEFs u.a. IBP/Def6 (Chen *et al.*, 2009), AKAP-13 (Shibolet *et al.*, 2007) und Vav1, 2 und 3 (Stovall *et al.*, 2004, Miletic *et al.*, 2007) nachgewiesen werden. Diese GEFs sollen auch eine Rolle bei der TLR-Signaltransduktion spielen. Vav1, 2 und 3 sind Rho GEFs, die den Austausch von GDP zu GTP in Rac1, RhoA und Cdc42 bewirken (Abe *et al.*, 2000, Jones, 2000). Bezüglich der Vav-Aktivierung über Proteintyrosinkinasen der Src-Familie (Syk, Src, Lyn u.a.) nach TLR-Aktivierung wurde berichtet, dass es zu einer Aktivierung von Vav1 in Raw 264.7 Makrophagen nach Stimulierung mit LPS oder CpG kommt und nachfolgend zur Ausschüttung von TNF α (Stovall *et al.*, 2004)(Abb. 4.1). Miletic *et al.* haben 2007 den Mechanismus der Vav-vermittelten Ausschüttung von TNF α beschrieben, indem sie zum Vergleich dreifach deletierte Δ Vav1, 2, 3 Makrophagen (Vav^{-/-}) verwendeten. Die Aktivierung von TLRs führt zur Aktivierung von IKK, NF κ B und MAPK- sowie des PI3K/Akt-Signalwegs. Während Vav 1, 2, 3 nicht beteiligt sind an der MyD88-abhängigen Aktivierung von NF κ B, kommt es in M-M Φ (Vav^{-/-}) zu geringerer Phosphorylierung von Akt. Vermutlich ist durch die Deletion von Vav die Aktivierung von Rac1 und damit der PI3K gestört, was die geringere Akt-Phosphorylierung erklärt (Miletic *et al.*, 2007). Ebenfalls kommt es durch die Vav1, 2, 3 -Gendeletion in M-M Φ zur geringeren Rac-Aktivierung sowie zu verminderter Produktion von Sauerstoffintermediaten (ROI) und abhängig davon zu verminderter p38-Aktivierung (Miletic *et al.*, 2007). ERK wird ebenfalls Vav1, 2, 3 abhängig reguliert, da es in M-M Φ (Vav^{-/-}) zur abgeschwächten und verspäteten ERK-Aktivierung kommt. Die Vav-abhängige Modulation der Signalwege hat Auswirkungen auf die sekretierten Zytokine. Es kommt zu verminderter TNF α -Sekretion und wahrscheinlich indirekt zu verminderter IL-10-Sekretion 24 h nach LPS-Stimulierung (Miletic *et al.*, 2007). Die Sekretion von IL-6 bleibt unbeeinflusst (Miletic *et al.*, 2007). Ein Vergleich dieser Ergebnisse der Vav/Rac-abhängigen Signalmodulationen mit dem Zytokinmuster der TLR-stimulierten M-M Φ (Rac1^{-/-}) ist sinnvoll. In den M-M Φ (Rac1^{-/-}) kommt es zwar zu geringerer Sekretion von TNF α , jedoch bereits nach 6 h zu verstärkter IL-10-Freisetzung, was im Vergleich mit M-M Φ (Vav^{-/-}) nicht übereinstimmt (Miletic *et al.*, 2007). Des Weiteren sekretieren M-M Φ (Rac1^{-/-}) weniger IL-12 und IL-6. Obwohl Vavs wichtige GEFs für Rho GTPasen in hämatopoetischen Zellen sind, könnten möglicherweise neben Vavs noch andere GEFs an der Rac-vermittelten Regulierung der Zytokinproduktion beteiligt sein. Mit dem Rac1-Inhibitor NSC23766 behandelte M-M Φ weisen bezüglich IL-12 und IL-10 ein ähnliches Zytokinsekretionsmuster auf, wie die M-M Φ (Rac1^{-/-}), obwohl nicht bekannt ist, inwiefern andere GEFs neben Tiam und Trio durch diesen Inhibitor gehemmt

werden. Neben den fehlerhaft regulierten Signalwegen, kann auch die Depletion einer Rho GTPase zu fehlerhafter GEF- und GAP-abhängiger Regulierung einer anderen Rho GTPase führen. Z.B. aktiviert Rac1-GTP das GAP p190A Rho-GAP und hemmt somit RhoA (Guilluy *et al.*, 2011) (Abb. 4.1). Darüber hinaus kann PAK1 GDI1-Rac1 sowie GDI1-RhoA Komplexe phosphorylieren. GDI1-Rac1 wird dadurch instabil, was zur verstärkten Rac1-Aktivierung führt, wogegen phosphorylierte GDI1-RhoA Komplexe stabil bleiben (Hemmung der RhoA-Aktivierung) (Dransart *et al.*, 2005; DerMardirossian *et al.*, 2006). Des Weiteren kann Rac1-GTP die Protein Kinase (PAK) 1 aktivieren, wodurch es zur Hemmung der RhoA GEFs p115-Rho-GEF oder auch GEF-H1 kommen kann (Guilluy *et al.*, 2011) (Abb.4.1). Falls aktives Rac1 die Aktivierung von RhoA hemmt oder die Inaktivierung von RhoA fördert, was den Gegenspielermechanismus erklären könnte, sollte man erwarten, dass M-MΦ mit einem doppel-*knockout* für Rac1 und RhoA (M-MΦ(Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-})) ein ähnliches Zytokinmuster aufweisen wie M-MΦ(Rac1^{-/-}). Jedoch ähnelt das Zytokinprofil von M-MΦ(Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-}) nach TLR-Stimulierung eher dem der M-MΦ(wt) bzw. den M-MΦ(RhoA^{-/-}). Plausibel ist, dass nach TLR-Aktivierung von M-MΦ(wt) zuerst RhoA aktiviert wird, was nachfolgend zur Rac1-Hemmung führt. Im Jahr 2007 wurde AKAP-13 als spezifischer RhoA GEF, der in Immunzellen am TLR-Signalweg beteiligt ist, beschrieben (Shibolet *et al.*, 2007) (Abb. 4.1). Die Stimulierung der humanen Makrophagenzelllinie THP-1 mit dem TLR2-Agonisten Pam3CSK4 führte zu erhöhter AKAP-13 mRNA-Expression. Wurden HEK293 Zellen, die stabil mit einem TLR2-Expressionsplasmid transfiziert wurden, zunächst mit AKAP-13 spezifischer siRNA inkubiert und dann mit Pam3CSK4 stimuliert, konnte im Vergleich mit Zellen ohne siRNA-Behandlung eine verminderte NFκB-abhängige Luciferasereporteraktivität und geringere Mengen IL-8 nachgewiesen werden. Die Mutation von AKAP-13 im Bereich der spezifischen RhoA-GEF-Domäne, aber nicht im Bereich der PKA-bindenden Domäne führt zu verminderter NFκB-abhängigen Luciferasereporteraktivität, was darauf hindeutet, dass AKAP-13 TLR2-abhängig RhoA aktiviert, was dann zur NFκB-Aktivierung führen könnte. Über diesen Weg aktiviertes RhoA-GTP könnte die Rho-Kinase ROCK aktivieren, wodurch es zur Hemmung des Rac1-GEF β-PIX kommen kann (Guilluy *et al.*, 2011), was die Aktivität von Rac1 unterdrücken würde (Abb. 4.1). Ob auch die in hämatopoetischen Zellen wichtigen Vavs durch RhoA/ROCK gehemmt werden, ist nicht beschrieben. Würde RhoA die Aktivität von Rac1 in M-MΦ nach TLR-Stimulierung unterdrücken, wäre ein Anstieg von IL-10 zu erwarten. M-MΦ(RhoA^{-/-}) zeigen eine gesteigerte IL-12-Sekretion (Gegenspieler von IL-10). Dieses Ergebnis passt zum Konzept, dass M-MΦ den M2 Makrophagen ähneln und verstärkt IL-10 ausschütten (Fleetwood *et al.*, 2009). Dabei würde RhoA als Verstärker für die IL-10-Sekretion fungieren.

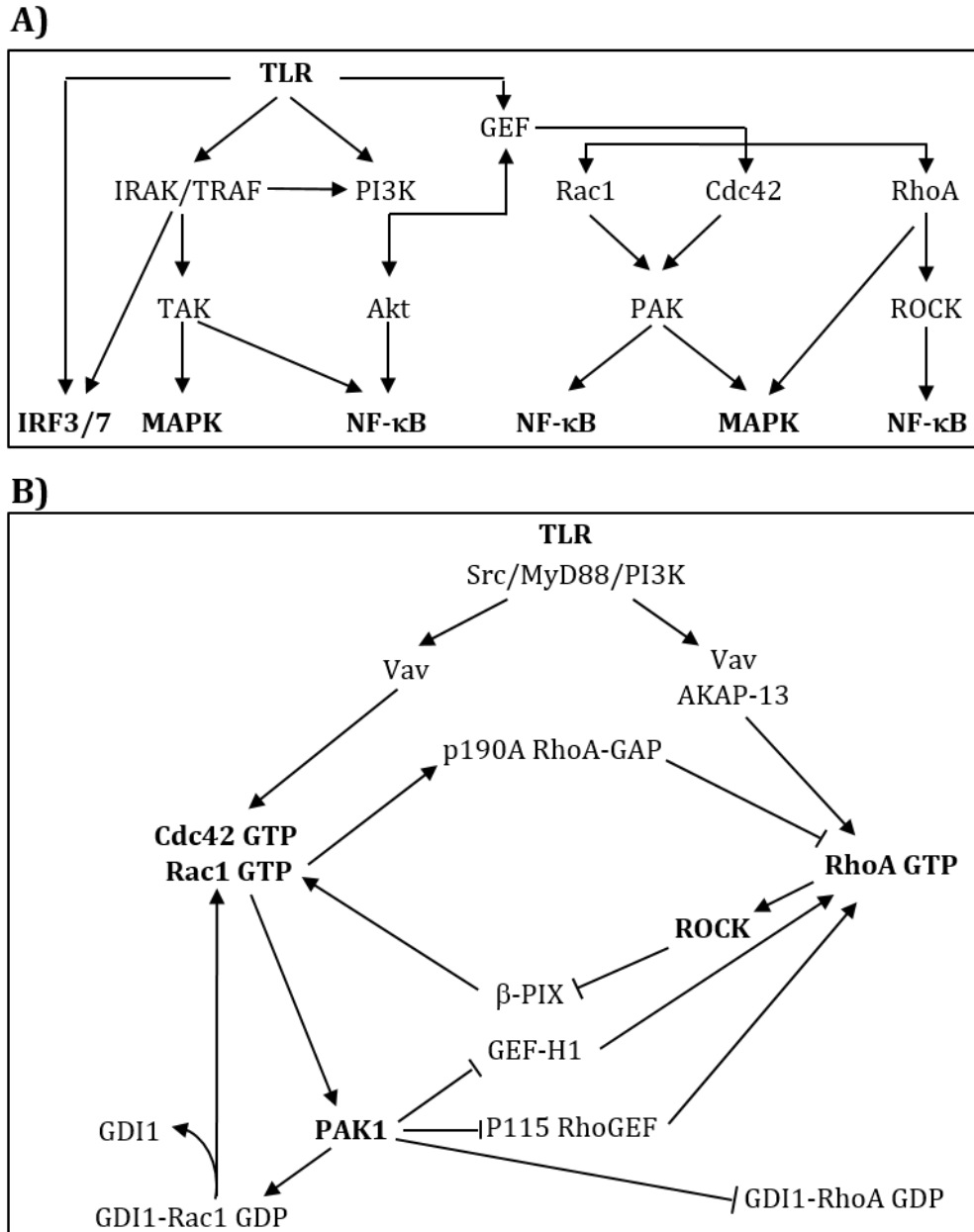


Abb. 4.1: A) Schematische Übersicht über TLR-vermittelte Signalwege. Nach TLR Aktivierung kommt es neben der Aktivierung des klassischen Signalwegs über IRAK/TRAF und TAK und folgender Aktivierung der MAPK und NFκB zur Aktivierung von PI3K, was die Phosphorylierung von Akt und NFκB-Aktivierung nach sich zieht. Nach PI3K-Aktivierung oder TLR-Stimulierung werden GEFs aktiviert, wodurch Rho GTPasen aktiviert werden. Nachfolgend werden Signalkaskaden angeschaltet, die in der Aktivierung von NFκB und MAPK münden. Rho GTPasen sind untereinander reguliert. Des Weiteren kommt es nach TLR-Aktivierung zur Hochregulation von IRF3/7 und im Folgenden zur Induzierung von Typ I Interferon. **B) Regulatorische Interaktionen zwischen Rac1 und RhoA.** TLR-Aktivierung führt neben der Aktivierung von MyD88 zur Aktivierung von GEFs (z.B. Vav oder AKAP-13) über Proteintyrosinkinasen oder PI3K. Durch Aktivierung von Effektorproteinen und Hemmung verschiedener GEFs oder Aktivierung von GAPs sind Rac1 und RhoA in der Lage, sich gegenseitig zu inhibieren. (nach Guilluy *et al.*, 2011). Für Einzelheiten siehe Text.

Es ist bekannt, dass dominant negatives Rac1 zu unspezifischer Hemmung der RhoA-Aktivität führen kann, wahrscheinlich über die Sequestrierung von GEFs (Debrececi *et al.*, 2003, Pedersen and Brakebusch, 2012). Ergänzende Versuche können Aufschluss darüber geben, ob es durch die De-

letion einer Rho GTPase in MΦ zu einer Aktivitätsänderung anderer Rho GTPasen kommt. Angenommen in M-MΦ(RhoA^{-/-}) kommt es zu einer stärkeren Aktivierung von Rac1, dann könnte es ebenfalls zu einer stärkeren Rac1-abhängigen Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten kommen. Es ist beschrieben, dass die Sauerstoffintermediate indirekt NFκB und MAP Kinasen aktivieren und so die Transkription proinflammatorischer Zytokine fördern können (Miletic *et al.*, 2007). Dieser Mechanismus könnte zur verstärkten Sekretion proinflammatorischer Zytokine von M-MΦ(RhoA^{-/-}) führen.

4.4 M-MΦ(Rac1^{-/-}) sezernieren verstärkt IL-10, M-MΦ(RhoA^{-/-}) sezernieren verstärkt IL-12

Wie oben beschrieben kann für TLR-aktivierte M-MΦ(Rac1^{-/-}) bzw. M-MΦ(RhoA^{-/-}) das Gegenspielerkonzept von Rac1 und RhoA die unterschiedliche Sekretion/Produktion von IL-12 erklären. Dabei konnte noch ein weiterer inverser Effekt gezeigt werden: bei einer verstärkten Sekretion von IL-10 kommt es in M-MΦ(Rac1^{-/-}) gleichzeitig zu einer verminderten Sekretion von IL-12 und bei einer verminderten Sekretion von IL-10 konnte in M-MΦ(RhoA^{-/-}) eine verstärkte Sekretion von IL-12 nachgewiesen werden. Bereits 1996 wurde von Koch *et al.* beschrieben, dass es in murinen DCs zur Hemmung von IL-12 durch IL-10 kommt (Koch *et al.*, 1996). Des Weiteren ist beschrieben, dass IL-10 die IL-12p40-Transkription in Peritonealmakrophagen hemmt (Zhou *et al.*, 2004). Die inhibitorische Wirkung von IL-10 auf die IL-12-Transkription wird dadurch erklärt, dass die IL-10-induzierte STAT3-Aktivierung einerseits die NFκB-Bindung an den IL-12-Promotor hemmt und andererseits STAT3-induziertes SOCS3 (*Suppressor of Cytokine Signaling*) die Signaltransduktion der Rezeptoren für IL-6 und IL-12, nicht aber für IL-10 hemmt (Murray, 2006). In MEF-Zellen (*Mouse Embryonic Fibroblast*) konnte gezeigt werden, dass sowohl Rac1 als auch RhoA und Cdc42 die Phosphorylierung von STAT3 an S727 und T705 über ihre Effektorkinasen bewirken können (Debidda *et al.*, 2005). Die Interaktion zwischen Rho GTPasen und STAT3 könnte zellspezifisch sein. Unter der Annahme, dass Rac1 indirekt RhoA hemmt und RhoA indirekt über ROCK/STAT3 aktiviert, was die Transkription proinflammatorischer Zytokine hemmt, würde in M-MΦ(Rac1^{-/-}) die RhoA-Aktivität länger persistieren, was die Aktivierung von STAT3 und die Hemmung der Transkription proinflammatorischer Zytokine zur Folge haben kann. Auch dieser Mechanismus könnte die gesteigerte Sekretion von IL-10 und verminderte Sekretion von IL-12 in M-MΦ(Rac1^{-/-}) erklären (S. 70, Abb. 3.18).

In M-MΦ(Rac1^{-/-}) konnte nach Stimulierung mit TLR2-, TLR4- sowie TLR9-Agonisten eine gesteigerte Sekretion von IL-10 nachgewiesen werden. Diese gesteigerte Sekretion von IL-10 in M-MΦ(Rac1^{-/-}) könnte im Sinne einer autokrinen Rückkopplung für die verminderte Sekretion von IL-12 verantwortlich sein. Die Zugabe von Antikörpern gegen IL-10 würde in PAMP-stimulierten M-MΦ(Rac1^{-/-}) die Bindung von IL-10 an den IL-10 Rezeptor verhindern. Somit wäre die

verminderte Sekretion von IL-12 ein sekundärer Effekt. Dieser sekundäre Effekt ist in TRAF3-*knockout* M-MΦ beschrieben worden (Häcker *et al.*, 2006). TRAF3 ist ein Adapterprotein für unterschiedlichste Rezeptoren, z.B. TNF Rezeptorsuperfamilie, TLRs und Zytokinrezeptoren. TRAF3 kann zelltyp- und rezeptorabhängig unterschiedliche Funktionen haben (Yi *et al.*, 2013). CpG oder LPS stimulierte TRAF3-*knockout* (TRAF3^{-/-}) M-MΦ sekretieren verstärkt IL-12 und IL-6, jedoch kein IL-10 (Häcker *et al.*, 2006). Erklärt wurde die Hochregulierung der Expression von proinflammatorischen Zytokinen mit der verminderten Sekretion von IL-10, da die Zugabe von exogenem IL-10 der verstärkten Sekretion von IL-12 und IL-6 entgegenwirkt. M-MΦ(RhoA^{-/-}) sezernieren nach TLR2-, TLR4- und TLR9-Aktivierung verstärkt IL-12 (S. 70, Abb. 3.18). Durch Zugabe von exogenem IL-10 könnte überprüft werden, ob die IL-12 Sekretion in M-MΦ(RhoA^{-/-}) reduziert wird. Der Mechanismus der Hemmung von IL-12 durch IL-10 ist nicht umkehrbar. Die Zugabe von exogenem IL-12 hat beispielsweise in DCs keinen Effekt auf die IL-10-Produktion (Xia and Kao, 2003).

Die Transkription von IL-10 und IL-12 kann auch durch die phosphorylierte Kinase Akt (P-Akt) gegensätzlich reguliert werden. Dabei kommt es durch die PI3K über PDK-1 zur Phosphorylierung von Akt und durch P-Akt zu einer Phosphorylierung und Inaktivierung von GSK3β. Wird GSK3β pharmakologisch gehemmt (oder durch P-Akt phosphoryliert), hat das eine verminderte Sekretion proinflammatorischer Zytokine und eine gesteigerte Sekretion von IL-10 in primären humanen Monozyten zur Folge (Martin *et al.*, 2005). Dieses Zytokinsekretionsmuster (proinflammatorische Zytokine vermindert, antiinflammatorische Zytokine erhöht) konnte in der vorliegenden Arbeit für M-MΦ(Rac1^{-/-}) gezeigt werden (S. 70, Abb. 3.18 und S. 78, 3.24). Für die M-MΦ(Rac1^{-/-}) könnte man bei einer möglichen Beteiligung des PI3K/Akt-Signalweges eine Erhöhung von P-Akt oder/und eine Erhöhung von P-GSK3β erwarten, die mittels Immunoblot und spezifischen Phosphoantikörpern nachzuweisen wäre. Wenn andererseits die PI3K für die Phosphorylierung von Akt verantwortlich ist und Rac1 z.B. über Vav in diesen Prozess involviert ist, sollte der P-Akt-Anteil in M-MΦ(Rac1^{-/-}) stark vermindert sein, was nach dem P-Akt/P-GSK3β-Konzept aber zu einem umgekehrten Zytokinsekretionsprofil (IL-10 niedrig/IL-12 hoch) führen sollte. Die vorläufigen Ergebnisse zur Phosphorylierung von GSK3β nach LPS-Stimulierung sind in M-MΦ(wt) sowie in Rho GTPase-gendelierte M-MΦ ähnlich und ändern sich nicht in der initialen Stimulierungsphase von 30 min (S. 86, Abb. 3.31). Durch die Hemmung von GSK3β kommt es zur Aktivierung von CREB (*cAMP Response Element-Binding Protein*), das in den Nukleus transloziert wird und durch die Assoziation mit CBP (*CREB Binding Protein*) die Transkription von IL-10 fördert. Dabei verdrängt CREB an Promotoren gebundenes NFκB von CBP. Die Bindung von NFκB an CBP fördert die Transkription von IL-12. Möglicherweise könnte es nach 30 min zu einer Verstärkung der GSK3β-Phosphorylierung in M-MΦ(Rac1^{-/-}) kommen (S. 86, Abb. 3.31). Eine synergistische Wirkung der Bindung von NFκB, CREB mit CBP kann am IL-6 Promotor vorliegen, was zu einer

starken Transkription von IL-6 führt (Spooren *et al.*, 2010). Die nachgewiesene Konzentration von IL-6 im Kulturüberstand war am stärksten in M-MΦ(Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-}) verglichen mit den mono-deletierten oder den Kontrollmakrophagen (M-MΦ(wt)) (S. 70, Abb. 3.18). Die stärkere Sekretion von IL-6 in M-MΦ(Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-}) könnte darauf hinweisen, dass die Rac1/RhoA-Doppeldeletion sowohl zur Verstärkung des NFκB-Signalwegs als auch zur CREB-Aktivierung beiträgt. Die Überprüfung der Phosphorylierung von CREB in den Rho GTPase-monodeletierten M-MΦ könnte dahingehend Aufschluss geben.

Auch die unterschiedliche Regulierung der MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinases*) p38, JNK und ERK (*Extracellular Signal-regulated Protein Kinase*) kann die proinflammatorische oder anti-inflammatorische Immunantwort modulieren. Es gibt drei große MAPK Familien: ERK, JNK (*c-Jun N-Terminal Kinase*) und p38. Sie werden durch Phosphorylierung durch die entsprechenden MAPK-Kinasen aktiviert und aktivieren nachfolgend Transkriptionsfaktoren wie NFκB und AP-1 (Newton and Dixit, 2012). Primäre regulatorische DCs sekretieren nach PAMP-Stimulierung im Gegensatz zu unreifen DCs durch erhöhte ERK-Aktivierung verstärkt IL-10 und durch p38-Hemmung vermindert IL-12 (Qian *et al.*, 2006). LPS-stimulierte J774 Mausmakrophagen sowie primäre Peritonealmakrophagen zeigen nach Hemmung von ERK erhöhte Mengen von IL-12(p40) sowie nach Hemmung von p38 verminderte IL-12(p40) Sekretion. In den Peritonealmakrophagen kommt es nach Hemmung von ERK oder p38 zu keiner Veränderung in der IL-10-Sekretion (Feng *et al.*, 1999). ERK und p38 scheinen also wie Rac1 und RhoA inverse Funktionen hinsichtlich IL-12 zu haben. Daher wurde die Phosphorylierung oder Aktivierung der MAP Kinasen in Rho GTPase depletierten M-MΦ untersucht. Die vorläufigen Daten zeigen keinen Unterschied in der Phosphorylierung der MAP Kinasen in den verschiedenen M-MΦ (S. 87, Abb. 3.32) für den initialen Zeitraum von 30 min. Ein verlängertes ERK Signal wurde in der Literatur mit verminderter IL-12-Expression in Verbindung gebracht (Monick *et al.*, 2003). Vorstellbar wäre, dass eine MAPK-abhängige Transkription von IL-12 oder IL-10 stattfindet und über die Dauer der Phosphorylierung der jeweiligen Kinase reguliert wird.

PAMP-stimulierte Makrophagen sekretieren neben Zytokinen auch Chemokine, die autokrin über die Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) auf die Makrophagen rückwirken können. Die GPCR-Signalwege können die TLR-Signalwege beeinflussen und überlagern. Prostaglandin PGE₂ wird nach PAMP-Stimulierung sekretiert. In mit LPS und PGE₂ stimulierte Knochenmarkmakrophagen kommt es zur Hemmung von TNFα, IL-12 sowie IL-6 und zum Anstieg der IL-10-Produktion (MacKenzie *et al.*, 2013). Durch die Bindung von PGE₂ an stimulatorische G-Proteine soll es zum Anstieg des intrazellulären cAMP Spiegels kommen und zur Aktivierung der Proteinkinase A und CREB, was dann die Transkription von IL-10 fördert. Auch die inhibitorischen G-Proteine können die TLR-Signalwege überlagern. Die Hemmung sowohl der stimulatorischen (G_{αs}) als auch der inhibitorischen (G_{αi}) G-Proteine in den Rho GTPase-depletierten M-MΦ kann

Aufschluss über eine mögliche Beteiligung der Rho GTPasen an den GPCR-Signalkaskaden geben und darüber, ob Überlagerungen der TLR-Signalwege mit GPCR zu den hier gezeigten Zytokinmustern führen (z.B. Hemmung von $G_{\alpha i}$ mit Pertussis Toxin).

4.5 Untersuchungen zur PI3K-Abhängigkeit der Rho GTPasen in TLR-Signalwegen

Die Familie der PI3K umfasst drei Klassen, die sich in ihrer Struktur, Substratpräferenz und ihrem zelltypspezifischen Vorkommen unterscheiden. Allen gemeinsam ist das Substrat Phosphatidylinositol. (Bader *et al.*, 2005). Die Klasse I wird unterteilt in 2 Subklassen IA und IB. Die Subklasse IA bildet Heterodimere, die aus einer katalytischen Untereinheit (p110 α , p110 β und p110 δ) sowie einer regulatorischen Untereinheit (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β , p55 γ) bestehen (Papakonstanti *et al.*, 2008). Dabei kommen die Untereinheiten p110 α und p110 β ubiquitär vor, die Expression von p110 δ dagegen ist in Leukozyten hochreguliert (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997). Die regulatorische Untereinheit interagiert über ihre SH2 (*Src Homology*) Domäne mit Phosphotyrosinresten von Membranrezeptoren und rekrutiert eine katalytische Untereinheit zur Membran. Diese phosphoryliert mit hoher Affinität Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PIP3), wodurch weitere Signalmoleküle zur Membran rekrutiert werden, unter anderem Akt und PDK-1 (*Phosphoinositide-dependent Kinase-1*) (Bader *et al.*, 2005). Die Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2 bewirkt die aktivierte Phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosom 10*).

PI3K kann über PIP3-sensitive Rac1-GEFs (u.a. Tiam, Vav oder P-Rex) zur Aktivierung von Rac1 beitragen oder auch durch direkte Bindung von PIP3 an Rac1 *in vitro* den Austausch von gebundenem GDP zu GTP erleichtern (Welch *et al.*, 2003). Dabei vermittelt Rac1 nicht alle PI3K-Signalwege. So ist der Insulin-abhängige Glucosetransport zwar PI3K-abhängig, aber Rac1-unabhängig. Des Weiteren gibt es eine positive Rückkopplung zwischen bereits aktiviertem Rac1 und der PI3K. Hinsichtlich der TLR-Signalwege konnte für PI3K sowohl ein negativer als auch ein positiver regulatorischer Einfluss beschrieben werden (Fukao and Koyasu, 2003). Negativ beeinflusst PI3K z.B. in Makrophagenzelllinien und primären DCs die TLR-Signalwege, so dass nach Hemmung der PI3K z.B. mit Wortmannin oder in p85-depletierten DCs eine verstärkte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen festgestellt wurde. Die Behandlung von Zellen mit Wortmannin führt in DCs zu gesteigerter p38-Aktivität, wodurch es zur verstärkten Expression von IL-12 kommt (Fukao *et al.*, 2002). Ein positiver Einfluss wurde von Arbibe *et al.* beschrieben. Hier wurde gezeigt, dass TLR2 einen Komplex mit p85 und Rac1 bildet und dass bei Hemmung einer dieser Komponenten in HEK293 Zellen oder der THP-1 Zelllinie die NF κ B-Aktivierung vermindert ist. Aufgrund des beschriebenen Modells, dass Rac1 und PI3K einen Signalkomplex bilden und über Akt NF κ B aktivieren, stellte sich die Frage, wie die PI3K die Zytokinsekretion in Rho GTPase-

depletierten M-M Φ beeinflusst. Bei einer Beteiligung von Rac1 an den PI3K vermittelten Signalwegen sollte es keinen Unterschied in der Sekretion von Zytokinen in M-M Φ (Rac1^{-/-}) vor und nach Hemmung der PI3K mit Wortmannin geben. Nachgewiesen wurde aber eine erhöhte Sekretion von IL-12 und verminderte Sekretion von IL-10 nach Hemmung der PI3K und anschließender Stimulierung mit Pam3CSK4 oder LPS (S.84, Abb. 3.29). Dabei konnte dieser Effekt in allen untersuchten Rho GTPase-depletierten M-M Φ gefunden werden. Das könnte bedeuten, dass Rac1 in M-M Φ die TLR-Signalwege PI3K-unabhängig beeinflusst. In der humanen Monozytenzelllinie THP-1 konnten Arbibe *et al.* nachweisen, dass die Aktivierung von NF κ B nach Hemmung der PI3K vermindert ist. Dabei soll p85 einen Komplex mit TLR2 und Rac1 nach Stimulierung mit hitzeinaktivierten Staphylokokken (HKSA, bindet TLR2 und andere Rezeptoren) bilden. Dieses Konzept, wonach die PI3K Rac1-abhängig den TLR2-Signalweg beeinflusst, erklärt nicht die hier in M-M Φ beobachteten Ergebnisse mit dem TLR2-Agonisten Pam3CSK4. HKSA co-stimuliert neben TLR2 auch andere Rezeptoren, z.B. Nod2 und α 5 β 1-Integrin, die u.a. die Sekretion von proinflammatorischem TNF α beeinflussen (Kapetanovic *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde Pam3CSK4 als Agonist verwendet, der ausschließlich an TLR2/TLR1 bindet. Möglicherweise lassen sich die Staphylokokken/TLR2-Daten von Arbibe *et al.* (PI3K-Hemmung führt über Rac1 zu verminderter NF κ B-Aktivierung nach Stimulierung mit HKSA) nicht mit den in dieser Arbeit von M-M Φ (Rac1^{-/-}) beschriebenen Daten (nach PI3K-Hemmung und Pam3CSK4-Stimulierung kommt es zu stärkerer Sekretion von IL-12 und verminderter Sekretion von IL-10) vergleichen. Ob PI3K zusammen mit TLR und Rac1 in M-M Φ (wt) einen Komplex bildet und ob in M-M Φ (Rac1^{-/-}) bei fehlendem Rac1 ein PI3K-RhoA/Cdc42 Komplex gebildet wird, wurde in der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Wortmannin bindet an die enzymatisch wirksamen p110-Untereinheiten (Kinasenhemmung), aber nicht an p85 (regulatorische Untereinheit) und inaktiviert so die PI3K (Wymann *et al.*, 1996). p85 bindet und stabilisiert p110 bei 37°C und die Depletion von p85 in DCs ist verantwortlich für den geringeren Nachweis von p110 (Fukao *et al.*, 2002). Die katalytische Aktivität der PI3K wird also in beiden Fällen gehemmt, ohne dass berücksichtigt wird, dass p110 α , β oder δ verschiedene spezifische Funktionen in der Zelle haben könnten. Wortmannin hemmt neben der PI3K unspezifisch noch weitere Kinasen wie mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*), ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) bzw. ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-related Protein*) (Marone *et al.*, 2008, Liu *et al.*, 2009). Hierbei wurde für mTOR eine Beteiligung an der Zytokinproduktion nachgewiesen. Wie PI3K scheint auch mTOR wichtig zu sein für die Expression antiinflammatorischer Zytokine. Die Hemmung von mTOR1 führt zu gesteigerter NF κ B-Aktivität und verstärkter IL-12-Sekretion (Weichhart *et al.*, 2008). 2008 wurde von Papakonstanti *et al.* beschrieben, dass Rac1 und RhoA durch p110 δ unterschiedlich reguliert werden (Papakonstanti *et al.*, 2008). In primären Makrophagen führt die Hemmung der p110-Isoformen zu reduzierter Rac1-Aktivität, die spezifische Hemmung von p110 δ jedoch auch zu gesteigerter RhoA- und PTEN-

Aktivität. Wenn p110 δ in M-M Φ zu einer Hemmung von RhoA führt, sollte die Inhibierung von p110 δ keinen Einfluss auf die M-M Φ (RhoA $^{-/-}$) haben und zu einem ähnlichen Zytokinsekretionsmuster führen, da Rac1 in M-M Φ weiterhin von p110 α und p110 β aktiviert werden kann. Eine Arbeit, in der aus humanen Monozyten generierte Makrophagen untersucht wurden, zeigt, dass die spezifische Hemmung von p110 α mit siRNA in LPS-stimulierten Makrophagen zu verminderter IL-12 mRNA und erhöhter IL-10 mRNA führt (Utsugi *et al.*, 2009). Das entspricht den hier gezeigten Ergebnissen von PAMP-stimulierten M-M Φ (Rac1 $^{-/-}$), in denen die Stimulierung mit LPS ebenfalls zu einer verminderten Sekretion von IL-12 und zu einer gesteigerten Sekretion von IL-10 führt. Der spezifische *Knock-down* von p110 β mittels siRNA führt zwar auch zu verminderter IL-12 mRNA aber gleichbleibender IL-10 mRNA verglichen mit Makrophagen, die mit Kontroll-RNA behandelt wurden (Utsugi *et al.*, 2009). p110 α und p110 β können also die TLR-Signalwege in Makrophagen unterschiedlich beeinflussen. p110 β kann neben der Aktivierung durch Rezeptortyrosinkinasen auch von GPCR ($G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit) aktiviert werden, was für p110 α nicht beschrieben wurde (Dbouk and Backer, 2012). Dies kann zu Überlagerung mit TLR-Signalwegen führen. Neben der spezifischen Hemmung der p110 Untereinheiten wurde von Utsugi *et al.* auch die Hemmung der PI3K-Isoformen mit Wortmannin untersucht, die überraschenderweise zu erhöhter mRNA von IL-12 führte. Durch die Hemmung mit Wortmannin in Rho GTPase depletierten M-M Φ kann daher keine Aussage darüber getroffen werden, ob die PI3K mit Rac1 oder RhoA interagiert und Rac1 oder RhoA PI3K-abhängig die TLR-Signalwege beeinflusst. Ergänzende Versuche zur Hemmung der PI3K mit spezifischen Inhibitoren für die jeweilige katalytische Untereinheit wären notwendig, um hierzu eine klarere Aussage treffen zu können. Unabhängig von den Rho GTPasen Rac1 und RhoA scheint die PI3K die TLR-Signalwege bezüglich der Bildung von proinflammatorischem IL-12 negativ und hinsichtlich der Bildung von IL-10 positiv zu beeinflussen.

4.6 Rho GTPase-depletierte M-M Φ als Modell für die Funktion von YopE und YopT auf die Zytokinfreisetzung

Pathogene Bakterien (z.B. Yersinien, Salmonellen und Shigellen) besitzen Effektorproteine (Virulenzfaktoren), die über bakterielle Typ 3 Sekretionssysteme (T3SS) in die Wirtszelle „injiziert“ werden können (Heesemann *et al.*, 2006, Mattoo *et al.*, 2007). Virulenzfaktoren beeinflussen die Funktion von Wirtsproteinen, um Signalwege zum Vorteil der Bakterien zu modulieren und damit der Immunantwort des Wirts zu entgehen. Während einer Infektion sekretieren Yersinien über das T3SS Yops, u.a. YopE und YopT in die Wirtszelle. Für YopE und YopT ist bekannt, dass sie Rho GTPasen modulieren. YopE aus *Y. enterocolitica* wirkt als GAP-Mimetikum und hemmt *in vitro* die Rho GTPasen RhoG, Rac1, RhoA und Cdc42, dabei ist die YopE vermittelte Hemmung von Rac1 über RhoG am stärksten (Aepfelbacher *et al.*, 2007). YopT aus *Y. enterocolitica* ist eine Cysteinprotease, durch die der terminale Geranylgeranyl-Cystein-Rest der Rho GTPasen abgespalten wird.

Damit sind die Rho GTPase nicht mehr membranverankert und wahrscheinlich inaktiv (Shao and Dixon, 2003). Die stärkste Aktivität von YopT ist für RhoA beschrieben (Aepfelbacher *et al.*, 2003). Da die Rho GTPasen einen Einfluss auf das Zytokinsekretionsmuster in M-M Φ haben, ist es höchst wahrscheinlich, dass auch YopE bzw. YopT durch Modulieren von Rho GTPasen das Zytokinsekretionsmuster von Makrophagen beeinflussen können, um die Antwort des Immunsystems zum Vorteil der Yersinien zu beeinflussen. Ein wichtiges Zytokin für die erfolgreiche Etablierung einer Yersinieninfektion ist IL-10. IL-10 *knockout* Mäuse sind resistenter gegen Yersinieninfektionen verglichen mit wt Mäusen (Sing *et al.*, 2002, Lenk, 2011). Das Yersinien V Antigen (LcrV) kann die Sekretion von IL-10 fördern und die Freisetzung von TNF α in Peritonealmakrophagen hemmen (Sing *et al.*, 2002). Da LcrV wahrscheinlich von Yersinien freigesetzt wird, könnte durch LcrV die TNF α -Sekretion in nicht infizierten Zellen gehemmt werden und die IL-10-Freisetzung gefördert werden (Bystander Effekt oder *Long Distance* Effekt (Heesemann *et al.*, 2006). In infizierten Zellen könnte die durch YopE-vermittelte Hemmung von Rac1 in M-M Φ die TLR-vermittelte Sekretion von IL-10 verstärken und dadurch zu einem erfolgreichen Etablieren der Infektion beitragen. Gleichzeitig könnte es durch IL-10 über Jak/STAT Signalwege zur Hemmung von IL-12 und/oder durch YopE/Rac1-vermittelt zur Hemmung der IL-12-Sekretion und damit zur Inhibierung der Th1-Antwort kommen. YopP kann durch Hemmung von NF κ B und MAP Kinase-Signalwegen die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine hemmen und die Apoptose induzieren (Ruckdeschel *et al.*, 2001). Dabei konnte die Wirkung von YopP erst 60-90 min nach der Infektion festgestellt werden (Ruckdeschel *et al.*, 2001). YopE könnte somit synergistisch zu YopP wirken und den YopP-Effekt hinsichtlich der Hemmung proinflammatorischer Zytokine zu frühen Zeitpunkten unterstützen. Bei einer Yersinieninfektion kommt es zur Translokation von YopE und YopT in die Wirtszelle, was dem Zustand der doppeldeletierten M-M Φ (Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-}) ähnelt. Die Wirkung beider Virulenzfaktoren sollte deshalb dem Zytokinsekretionsmuster der TLR-aktivierten M-M Φ (Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-}) ähneln. Hinsichtlich IL-12 und IL-10 würden sich die YopE- und YopT-Effekte kompensieren. Allerdings konnte gezeigt werden, dass YopT nicht nur RhoA hemmt, sondern vermutlich auch Rac1 (Wölke, 2010). Bei einer Translokation von YopE und YopT könnte dadurch Rac1 stärker gehemmt sein als RhoA und die beobachteten Effekte der M-M Φ (Rac1^{-/-}/RhoA^{-/-}) nicht auf die Yersinieninfektion übertragbar sein, da die Deletion der Rho GTPasen in den M-M Φ etwa gleich stark ist. Viboud *et al.* untersuchten den möglichen Einfluss von YopE und YopT aus *Yersinia pseudotuberculosis* auf die Sekretion von IL-8 in infizierten HeLa-Zellen (Viboud *et al.*, 2006). Für YopE aus *Y. pseudotuberculosis* ist gezeigt, dass sowohl Rac1 als auch RhoA gehemmt wird. Das Substrat für YopT ist ebenfalls Rac1 und RhoA. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl YopE als auch YopT aus *Y. pseudotuberculosis* in der Lage sind, die Sekretion von IL-8 in infizierten HeLa Zellen zu unterdrücken, jedoch nicht in gleichem Maße (Viboud *et al.*, 2006). Durch YopE wurde die Sekretion von IL-8 stärker gehemmt als durch YopT. In HeLa Zellen könnte

die Hemmung von IL-8 auch YopE/Rac1-abhängig sein und die YopE-vermittelte Rac1-Hemmung stärker, als die RhoA-Hemmung, was zur Unterdrückung der proinflammatorischen Zytokine führen müsste. Das könnte für *Y. enterocolica* bedeuten, dass die YopE-vermittelte Hemmung von Rac1 stärker ist als die YopT-vermittelte Hemmung von RhoA. Außerdem könnten sich YopE- und YopT-vermittelte Hemmung von Rac1 addieren. Damit müsste es bei einer Yersinieninfektion mit YopE zu verminderter IL-12-Sekretion und gesteigerten IL-10-Freisetzung kommen. Die Translokation von YopT hätte ebenfalls diesen Effekt hinsichtlich des Zytokinmusters wegen der Hemmung von Rac1, aber zu einem geringeren Maße und die Translokation beider Effektoren sollte zum Hemmen der proinflammatorischen Zytokine führen. Der hier dargestellte YopE- und YopT-Effekt hinsichtlich der Zytokinsekretion in Immunzellen könnte aber auch ein sekundärer unerwünschter Effekt sein, der von Yersinien durch YopP unterdrückt wird. Im Vergleich dazu führen bakterielle Aktivatoren von Rac1 wie z.B. EspT aus *E.coli* zur stärkeren Sekretion von IL-8 in U937 Makrophagen (Raymond *et al.*, 2011). Dies ist der gegensätzliche Effekt, den man für die Infektion mit YopE-translozierenden Yersinien erwarten würde. Das zeigt, dass pathogenen Bakterien über Rac1-Modulation nicht nur die Phagozytose und die ROI-Entwicklung kontrollieren, sondern auch in der Lage sind, die Sekretion der Zytokine zu ihrem Vorteil zu beeinflussen.

5. Literaturverzeichnis

- Abe,K., Rossman,K.L., Liu,B., Ritola,K.D., Chiang,D., Campbell,S.L., Burridge,K., and Der,C.J. (2000). Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA. *J. Biol. Chem.* 275, 10141-10149.
- Aepfelbacher,M., Trasak,C., and Ruckdeschel,K. (2007). Effector functions of pathogenic *Yersinia* species. *Thromb. Haemost.* 98, 521-529.
- Aepfelbacher,M., Trasak,C., Wilharm,G., Wiedemann,A., Trulzsch,K., Krauss,K., Gierschik,P., and Heesemann,J. (2003). Characterization of YopT effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. *J. Biol. Chem.* 278, 33217-33223.
- Akira,S. (2000). Toll-like receptors: lessons from knockout mice. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 551-556.
- Akira,S. and Takeda,K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499-511.
- Akira,S., Uematsu,S., and Takeuchi,O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Anderson,K.V., Bokla,L., and Nusslein-Volhard,C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42, 791-798.
- Arbibe,L., Mira,J.P., Teusch,N., Kline,L., Guha,M., Mackman,N., Godowski,P.J., Ulevitch,R.J., and Knaus,U.G. (2000). Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat. Immunol.* 1, 533-540.
- Bader,A.G., Kang,S., Zhao,L., and Vogt,P.K. (2005). Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat. Rev. Cancer* 5, 921-929.
- Baud,V. and Karin,M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 11, 372-377.
- Beier,F. and Loeser,R.F. (2010). Biology and pathology of Rho GTPase, PI-3 kinase-Akt, and MAP kinase signaling pathways in chondrocytes. *J. Cell Biochem.* 110, 573-580.
- Beutler,B. (2009). Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunol. Rev.* 227, 248-263.
- Biswas,S.K. and Mantovani,A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* 11, 889-896.
- Blasius,A.L. and Beutler,B. (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity.* 32, 305-315.
- Borregaard,N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* 33, 657-670.
- Borysiewicz,E., Fil,D., and Konat,G.W. (2009). Rho proteins are negative regulators of TLR2, TLR3, and TLR4 signaling in astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 87, 1565-1572.
- Braun,M.C. and Kelsall,B.L. (2001). Regulation of interleukin-12 production by G-protein-coupled receptors. *Microbes. Infect.* 3, 99-107.
- Brint,E.K., Xu,D., Liu,H., Dunne,A., McKenzie,A.N., O'Neill,L.A., and Liew,F.Y. (2004). ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat. Immunol.* 5, 373-379.

- Burns,K., Janssens,S., Brissoni,B., Olivos,N., Beyaert,R., and Tschopp,J. (2003). Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J. Exp. Med.* *197*, 263-268.
- Cappello,S., Bohringer,C.R., Bergami,M., Conzelmann,K.K., Ghanem,A., Tomassy,G.S., Arlotta,P., Mainardi,M., Allegra,M., Caleo,M., van,H.J., Brakebusch,C., and Gotz,M. (2012). A radial glia-specific role of RhoA in double cortex formation. *Neuron* *73*, 911-924.
- Chardin,P. (2006). Function and regulation of Rnd proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 54-62.
- Chen,F., Ma,L., Parrini,M.C., Mao,X., Lopez,M., Wu,C., Marks,P.W., Davidson,L., Kwiatkowski,D.J., Kirchhausen,T., Orkin,S.H., Rosen,F.S., Mayer,B.J., Kirschner,M.W., and Alt,F.W. (2000). Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr. Biol.* *10*, 758-765.
- Chen,L.Y., Zuraw,B.L., Liu,F.T., Huang,S., and Pan,Z.K. (2002). IL-1 receptor-associated kinase and low molecular weight GTPase RhoA signal molecules are required for bacterial lipopolysaccharide-induced cytokine gene transcription. *J. Immunol.* *169*, 3934-3939.
- Chen,Q., Gupta,S., and Pernis,A.B. (2009). Regulation of TLR4-mediated signaling by IBP/Def6, a novel activator of Rho GTPases. *J. Leukoc. Biol.* *85*, 539-543.
- Clarke,S. and Gordon,S. (1998). Myeloid-specific gene expression. *J. Leukoc. Biol.* *63*, 153-168.
- Clausen,B.E., Burkhardt,C., Reith,W., Renkawitz,R., and Forster,I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* *8*, 265-277.
- Croke,M., Ross,F.P., Korhonen,M., Williams,D.A., Zou,W., and Teitelbaum,S.L. (2011). Rac deletion in osteoclasts causes severe osteopetrosis. *J. Cell Sci.* *124*, 3811-3821.
- Dauphinee,S.M. and Karsan,A. (2006). Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* *86*, 9-22.
- Debidda,M., Wang,L., Zang,H., Poli,V., and Zheng,Y. (2005). A role of STAT3 in Rho GTPase-regulated cell migration and proliferation. *J. Biol. Chem.* *280*, 17275-17285.
- Debrececi,B., Gao,Y., Guo,F., Zhu,K., Jia,B., and Zheng,Y. (2004). Mechanisms of guanine nucleotide exchange and Rac-mediated signaling revealed by a dominant negative trio mutant. *J. Biol. Chem.* *279*, 3777-3786.
- DerMardirossian,C. and Bokoch,G.M. (2001). Regulation of cell function by Rho GTPases. *Drug News Perspect.* *14*, 389-395.
- DerMardirossian,C., Rocklin,G., Seo,J.Y., and Bokoch,G.M. (2006). Phosphorylation of RhoGDI by Src regulates Rho GTPase binding and cytosol-membrane cycling. *Mol. Biol. Cell* *17*, 4760-4768.
- Divanovic,S., Trompette,A., Atabani,S.F., Madan,R., Golenbock,D.T., Visintin,A., Finberg,R.W., Tarakhovskiy,A., Vogel,S.N., Belkaid,Y., Kurt-Jones,E.A., and Karp,C.L. (2005). Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat. Immunol.* *6*, 571-578.
- Dransart,E., Olofsson,B., and Cherfils,J. (2005). RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic.* *6*, 957-966.
- Duran,A., az-Meco,M.T., and Moscat,J. (2003). Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-kappaB transcriptional activation. *EMBO J.* *22*, 3910-3918.

- Equils,O., Madak,Z., Liu,C., Michelsen,K.S., Bulut,Y., and Lu,D. (2004). Rac1 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter protein mediate Toll-like receptor 4 induction of HIV-long terminal repeat. *J. Immunol.* *172*, 7642-7646.
- Faust,N., Varas,F., Kelly,L.M., Heck,S., and Graf,T. (2000). Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood* *96*, 719-726.
- Feng,G.J., Goodridge,H.S., Harnett,M.M., Wei,X.Q., Nikolaev,A.V., Higson,A.P., and Liew,F.Y. (1999). Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J. Immunol.* *163*, 6403-6412.
- Fleetwood,A.J., Lawrence,T., Hamilton,J.A., and Cook,A.D. (2007). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J. Immunol.* *178*, 5245-5252.
- Fleetwood,A.J., Dinh,H., Cook,A.D., Hertzog,P.J., and Hamilton,J.A. (2009). GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *J. Leukoc. Biol.* *86*, 411-421.
- Fox,B.A., Sheppard,P.O., and O'Hara,P.J. (2009). The role of genomic data in the discovery, annotation and evolutionary interpretation of the interferon-lambda family. *PLoS. One.* *4*, e4933.
- Fukao,T. and Koyasu,S. (2003). PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol.* *24*, 358-363.
- Fukao,T., Tanabe,M., Terauchi,Y., Ota,T., Matsuda,S., Asano,T., Kadowaki,T., Takeuchi,T., and Koyasu,S. (2002). PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nat. Immunol.* *3*, 875-881.
- Geissmann,F., Manz,M.G., Jung,S., Sieweke,M.H., Merad,M., and Ley,K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* *327*, 656-661.
- Gillmaier,N., Gotz,A., Schulz,A., Eisenreich,W., and Goebel,W. (2012). Metabolic responses of primary and transformed cells to intracellular *Listeria monocytogenes*. *PLoS. One.* *7*, e52378.
- Glogauer,M., Marchal,C.C., Zhu,F., Worku,A., Clausen,B.E., Foerster,I., Marks,P., Downey,G.P., Dinanuer,M., and Kwiatkowski,D.J. (2003). Rac1 deletion in mouse neutrophils has selective effects on neutrophil functions. *J. Immunol.* *170*, 5652-5657.
- Guilluy,C., Garcia-Mata,R., and Burridge,K. (2011). Rho protein crosstalk: another social network? *Trends Cell Biol.* *21*, 718-726.
- Hacker,H., Redecke,V., Blagoev,B., Kratchmarova,I., Hsu,L.C., Wang,G.G., Kamps,M.P., Raz,E., Wagner,H., Hacker,G., Mann,M., and Karin,M. (2006). Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* *439*, 204-207.
- Hall,A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* *279*, 509-514.
- Hamaguchi,M., Meth,J.L., von,K.C., Wei,W., Esposito,D., Rodgers,L., Walsh,T., Welcsh,P., King,M.C., and Wigler,M.H. (2002). DBC2, a candidate for a tumor suppressor gene involved in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 13647-13652.

- Hammer,M., Mages,J., Dietrich,H., Schmitz,F., Striebel,F., Murray,P.J., Wagner,H., and Lang,R. (2005). Control of dual-specificity phosphatase-1 expression in activated macrophages by IL-10. *Eur. J. Immunol.* *35*, 2991-3001.
- Hardy,M.P. and O'Neill,L.A. (2004). The murine IRAK2 gene encodes four alternatively spliced isoforms, two of which are inhibitory. *J. Biol. Chem.* *279*, 27699-27708.
- Hashimoto,D., Miller,J., and Merad,M. (2011). Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity.* *35*, 323-335.
- Heasman,S.J. and Ridley,A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 690-701.
- Heesemann,J., Sing,A., and Trulzsch,K. (2006). Yersinia's stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Curr. Opin. Microbiol.* *9*, 55-61.
- Hicks,S.W. and Galan,J.E. (2013). Exploitation of eukaryotic subcellular targeting mechanisms by bacterial effectors. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 316-326.
- Hildebrand,D., Sahr,A., Wolfle,S.J., Heeg,K., and Kubatzky,K.F. (2012). Regulation of Toll-like receptor 4-mediated immune responses through *Pasteurella multocida* toxin-induced G protein signaling. *Cell Commun. Signal.* *10*, 22.
- Hu,X., Paik,P.K., Chen,J., Yarinina,A., Kockeritz,L., Lu,T.T., Woodgett,J.R., and Ivashkiv,L.B. (2006). IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity.* *24*, 563-574.
- Huising,M.O., Kruiswijk,C.P., and Flik,G. (2006). Phylogeny and evolution of class-I helical cytokines. *J. Endocrinol.* *189*, 1-25.
- Iden,S. and Collard,J.G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 846-859.
- Inaba,K., Swiggard,W.J., Steinman,R.M., Romani,N., Schuler,G., and Brinster,C. (2009). Isolation of dendritic cells. *Curr. Protoc. Immunol. Chapter 3*, Unit.
- Itai,T., Tanaka,M., and Nagata,S. (2001). Processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF-alpha-converting enzyme, but not its truncated soluble form. *Eur. J. Biochem.* *268*, 2074-2082.
- Janeway,C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *54 Pt 1*, 1-13.
- Janeway,C.A., Jr. and Medzhitov,R. (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 197-216.
- Janeway,C.A., Murphy K., Travers P., and Walport M. (2008). *Janeway's Immunobiology.*(New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC).
- Jones,G.E. (2000). Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. *J. Leukoc. Biol.* *68*, 593-602.
- Kagan,J.C. and Medzhitov,R. (2006). Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* *125*, 943-955.

- Kapetanovic,R., Parlato,M., Fitting,C., Quesniaux,V., Cavaillon,J.M., and dib-Conquy,M. (2011). Mechanisms of TNF induction by heat-killed *Staphylococcus aureus* differ upon the origin of mononuclear phagocytes. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 300, C850-C859.
- Kawai,T. and Akira,S. (2007). TLR signaling. *Semin. Immunol.* 19, 24-32.
- Kawai,T. and Akira,S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11, 373-384.
- Kawai,T. and Akira,S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 34, 637-650.
- Kjoller,L. and Hall,A. (1999). Signaling to Rho GTPases. *Exp. Cell Res.* 253, 166-179.
- Koch,F., Stanzl,U., Jennewein,P., Janke,K., Heufler,C., Kampgen,E., Romani,N., and Schuler,G. (1996). High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* 184, 741-746.
- Kopf,M., Baumann,H., Freer,G., Freudenberg,M., Lamers,M., Kishimoto,T., Zinkernagel,R., Bluethmann,H., and Kohler,G. (1994). Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368, 339-342.
- Krause,C.D. and Pestka,S. (2005). Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives. *Pharmacol. Ther.* 106, 299-346.
- Kumar,H., Kawai,T., and Akira,S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 621-625.
- Lacey,D.C., Achuthan,A., Fleetwood,A.J., Dinh,H., Roiniotis,J., Scholz,G.M., Chang,M.W., Beckman,S.K., Cook,A.D., and Hamilton,J.A. (2012). Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J. Immunol.* 188, 5752-5765.
- Lacy,P. and Stow,J.L. (2011). Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood* 118, 9-18.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lang,R., Patel,D., Morris,J.J., Rutschman,R.L., and Murray,P.J. (2002). Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J. Immunol.* 169, 2253-2263.
- Lemichez,E. and Aktories,K. (2013). Hijacking of Rho GTPases during bacterial infection. *Exp. Cell Res.* 319, 2329-2336.
- Lenk, E., (2011). Die Rolle der angeborenen Immunität für die *Yersinia*-Infektion im Mausmodell. Dissertation, LMU München: Fakultät für Biologie, Ref. Type: Thesis/Dissertation
- Lewandoski,M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat. Rev. Genet.* 2, 743-755.
- Li,G.B. and Lu,G.X. (2010). Adherent cells in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced bone marrow-derived dendritic cell culture system are qualified dendritic cells. *Cell Immunol.* 264, 4-6.
- Lu,Y.C., Yeh,W.C., and Ohashi,P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145-151.

- Lutz,M.B., Kukutsch,N., Ogilvie,A.L., Rossner,S., Koch,F., Romani,N., and Schuler,G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* 223, 77-92.
- MacKenzie,K.F., Clark,K., Naqvi,S., McGuire,V.A., Noehren,G., Kristariyanto,Y., van den,B.M., Mudaliar,M., McCarthy,P.C., Pattison,M.J., Pedrioli,P.G., Barton,G.J., Toth,R., Prescott,A., and Arthur,J.S. (2013). PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway. *J. Immunol.* 190, 565-577.
- Madrid,L.V., Mayo,M.W., Reuther,J.Y., and Baldwin,A.S., Jr. (2001). Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J. Biol. Chem.* 276, 18934-18940.
- Mansell,A. and Jenkins,B.J. (2013). Dangerous liaisons between interleukin-6 cytokine and toll-like receptor families: a potent combination in inflammation and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 24, 249-256.
- Mansell,A., Smith,R., Doyle,S.L., Gray,P., Fenner,J.E., Crack,P.J., Nicholson,S.E., Hilton,D.J., O'Neill,L.A., and Hertzog,P.J. (2006). Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat. Immunol.* 7, 148-155.
- Marone,R., Cmilianovic,V., Giese,B., and Wymann,M.P. (2008). Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 159-185.
- Martin,M., Rehani,K., Jope,R.S., and Michalek,S.M. (2005). Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat. Immunol.* 6, 777-784.
- Martinez,F.O., Helming,L., and Gordon,S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451-483.
- Mathew,S.J., Haubert,D., Kronke,M., and Leptin,M. (2009). Looking beyond death: a morphogenetic role for the TNF signalling pathway. *J. Cell Sci.* 122, 1939-1946.
- Mattoo,S., Lee,Y.M., and Dixon,J.E. (2007). Interactions of bacterial effector proteins with host proteins. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 392-401.
- Medzhitov,R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826.
- Miletic,A.V., Graham,D.B., Montgrain,V., Fujikawa,K., Kloeppe,T., Brim,K., Weaver,B., Schreiber,R., Xavier,R., and Swat,W. (2007). Vav proteins control MyD88-dependent oxidative burst. *Blood* 109, 3360-3368.
- Misra,R.P. and Duncan,S.A. (2002). Gene targeting in the mouse: advances in introduction of transgenes into the genome by homologous recombination. *Endocrine.* 19, 229-238.
- Monick,M.M., Powers,L.S., Butler,N.S., and Hunninghake,G.W. (2003). Inhibition of Rho family GTPases results in increased TNF-alpha production after lipopolysaccharide exposure. *J. Immunol.* 171, 2625-2630.
- Moon,S.Y. and Zheng,Y. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol.* 13, 13-22.
- Morgan,M.J. and Liu,Z.G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res.* 21, 103-115.

- Mosser,D.M. and Edwards,J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 958-969.
- Murata,H., Ihara,Y., Nakamura,H., Yodoi,J., Sumikawa,K., and Kondo,T. (2003). Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt. *J. Biol. Chem.* *278*, 50226-50233.
- Murray,P.J. (2006). STAT3-mediated anti-inflammatory signalling. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 1028-1031.
- Murray,P.J. and Wynn,T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 723-737.
- Nathan,C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 173-182.
- Nelms,K., Keegan,A.D., Zamorano,J., Ryan,J.J., and Paul,W.E. (1999). The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 701-738.
- Newton,K. and Dixit,V.M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*.
- O'Farrell,A.M., Liu,Y., Moore,K.W., and Mui,A.L. (1998). IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* *17*, 1006-1018.
- Ohtani,M., Nagai,S., Kondo,S., Mizuno,S., Nakamura,K., Tanabe,M., Takeuchi,T., Matsuda,S., and Koyasu,S. (2008). Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. *Blood* *112*, 635-643.
- Olofsson,B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal.* *11*, 545-554.
- Ouyang,W., Rutz,S., Crellin,N.K., Valdez,P.A., and Hymowitz,S.G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 71-109.
- Papakonstanti,E.A., Zwaenepoel,O., Bilancio,A., Burns,E., Nock,G.E., Houseman,B., Shokat,K., Ridley,A.J., and Vanhaesebroeck,B. (2008). Distinct roles of class IA PI3K isoforms in primary and immortalised macrophages. *J. Cell Sci.* *121*, 4124-4133.
- Pedersen,E., Basse,A., Lefever,T., Peyrollier,K., and Brakebusch,C. (2012). Rho GTPase knockout induction in primary keratinocytes from adult mice. *Methods Mol. Biol.* *827*, 157-166.
- Pedersen,E. and Brakebusch,C. (2012). Rho GTPase function in development: how in vivo models change our view. *Exp. Cell Res.* *318*, 1779-1787.
- Perera,P.Y., Mayadas,T.N., Takeuchi,O., Akira,S., Zaks-Zilberman,M., Goyert,S.M., and Vogel,S.N. (2001). CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J. Immunol.* *166*, 574-581.
- Pestka,S., Krause,C.D., Sarkar,D., Walter,M.R., Shi,Y., and Fisher,P.B. (2004). Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 929-979.
- Plageman,T.F., Jr., Chauhan,B.K., Yang,C., Jaudon,F., Shang,X., Zheng,Y., Lou,M., Debant,A., Hildebrand,J.D., and Lang,R.A. (2011). A Trio-RhoA-Shroom3 pathway is required for apical constriction and epithelial invagination. *Development* *138*, 5177-5188.

- Puls,A., Eliopoulos,A.G., Nobes,C.D., Bridges,T., Young,L.S., and Hall,A. (1999). Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF(alpha) and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1. *J. Cell Sci.* *112 (Pt 17)*, 2983-2992.
- Qian,C., Jiang,X., An,H., Yu,Y., Guo,Z., Liu,S., Xu,H., and Cao,X. (2006). TLR agonists promote ERK-mediated preferential IL-10 production of regulatory dendritic cells (diffDCs), leading to NK-cell activation. *Blood* *108*, 2307-2315.
- Qin,J., Qian,Y., Yao,J., Grace,C., and Li,X. (2005). SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms. *J. Biol. Chem.* *280*, 25233-25241.
- Raymond,B., Crepin,V.F., Collins,J.W., and Frankel,G. (2011). The WxxxE effector EspT triggers expression of immune mediators in an Erk/JNK and NF-kappaB-dependent manner. *Cell Microbiol.* *13*, 1881-1893.
- Rey,J.M., Pujol,P., Callier,P., Cavailles,V., Freiss,G., Maudelonde,T., and Brouillet,J.P. (2000). Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to evaluate the expression patterns of genes involved in the oestrogen pathway. *J. Mol. Endocrinol.* *24*, 433-440.
- Reynaert,N.L., van,d., V, Guala,A.S., McGovern,T., Hristova,M., Pantano,C., Heintz,N.H., Heim,J., Ho,Y.S., Matthews,D.E., Wouters,E.F., and Janssen-Heininger,Y.M. (2006). Dynamic redox control of NF-kappaB through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory kappaB kinase beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 13086-13091.
- Ridley,A. (2000). Rho GTPases. Integrating integrin signaling. *J. Cell Biol.* *150*, F107-F109.
- Rieger M. and Schroeder T. (2007). Hämatopoetische Stammzellen. *Biospektrum*.
- Rosas,M., Osorio,F., Robinson,M.J., Davies,L.C., Dierkes,N., Jones,S.A., Reis e Sousa, and Taylor,P.R. (2011). Hoxb8 conditionally immortalised macrophage lines model inflammatory monocytic cells with important similarity to dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *41*, 356-365.
- Ruckdeschel,K., Mannel,O., Richter,K., Jacobi,C.A., Trulzsch,K., Rouot,B., and Heesemann,J. (2001). Yersinia outer protein P of Yersinia enterocolitica simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J. Immunol.* *166*, 1823-1831.
- Ruse,M. and Knaus,U.G. (2006). New players in TLR-mediated innate immunity: PI3K and small Rho GTPases. *Immunol. Res.* *34*, 33-48.
- Sa,S.M., Valdez,P.A., Wu,J., Jung,K., Zhong,F., Hall,L., Kasman,I., Winer,J., Modrusan,Z., Danilenko,D.M., and Ouyang,W. (2007). The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J. Immunol.* *178*, 2229-2240.
- Sanlioglu,S., Williams,C.M., Samavati,L., Butler,N.S., Wang,G., McCray,P.B., Jr., Ritchie,T.C., Hunninghake,G.W., Zandi,E., and Engelhardt,J.F. (2001). Lipopolysaccharide induces Rac1-dependent reactive oxygen species formation and coordinates tumor necrosis factor-alpha secretion through IKK regulation of NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* *276*, 30188-30198.
- Saraiva,M. and O'Garra,A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 170-181.
- Schlessinger,K., Hall,A., and Tolwinski,N. (2009). Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes Dev.* *23*, 265-277.

- Schlumberger, M.C. and Hardt, W.D. (2006). Salmonella type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 46-54.
- Schmeck, B., Beermann, W., N'Guessan, P.D., Hocke, A.C., Opitz, B., Eitel, J., Dinh, Q.T., Witzentrath, M., Krull, M., Suttorp, N., and Hippenstiel, S. (2008). Simvastatin reduces Chlamydia pneumoniae-mediated histone modifications and gene expression in cultured human endothelial cells. *Circ. Res.* 102, 888-895.
- Seabra, M.C. (1998). Membrane association and targeting of prenylated Ras-like GTPases. *Cell Signal.* 10, 167-172.
- Shao, F. and Dixon, J.E. (2003). YopT is a cysteine protease cleaving Rho family GTPases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 529, 79-84.
- Shibolet, O., Giallourakis, C., Rosenberg, I., Mueller, T., Xavier, R.J., and Podolsky, D.K. (2007). AKAP13, a RhoA GTPase-specific guanine exchange factor, is a novel regulator of TLR2 signaling. *J. Biol. Chem.* 282, 35308-35317.
- Sing, A., Roggenkamp, A., Geiger, A.M., and Heesemann, J. (2002). Yersinia enterocolitica evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J. Immunol.* 168, 1315-1321.
- Smits, K., Iannucci, V., Stove, V., Van, H.P., Naessens, E., Meuwissen, P.J., Arien, K.K., Bentahir, M., Plum, J., and Verhasselt, B. (2010). Rho GTPase Cdc42 is essential for human T-cell development. *Haematologica* 95, 367-375.
- Spooren, A., Kooijman, R., Lintermans, B., Van, C.K., Vermeulen, L., Haegeman, G., and Gerlo, S. (2010). Cooperation of NFkappaB and CREB to induce synergistic IL-6 expression in astrocytes. *Cell Signal.* 22, 871-881.
- Stanley, A.C., Wong, C.X., Micaroni, M., Venturato, J., Khromykh, T., Stow, J.L., and Lacy, P. (2014). The Rho GTPase Rac1 is required for recycling endosome-mediated secretion of TNF in macrophages. *Immunol. Cell Biol.* 92, 275-286.
- Staples, K.J., Smallie, T., Williams, L.M., Foey, A., Burke, B., Foxwell, B.M., and Ziegler-Heitbrock, L. (2007). IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3. *J. Immunol.* 178, 4779-4785.
- Stovall, S.H., Yi, A.K., Meals, E.A., Talati, A.J., Godambe, S.A., and English, B.K. (2004). Role of vav1- and src-related tyrosine kinases in macrophage activation by CpG DNA. *J. Biol. Chem.* 279, 13809-13816.
- Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A., and Katsuki, M. (1998). Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* 17, 3427-3433.
- Taga, T. and Kishimoto, T. (1997). Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 797-819.
- Takeda, K., Clausen, B.E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Forster, I., and Akira, S. (1999). Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity.* 10, 39-49.

- Teusch,N., Lombardo,E., Eddleston,J., and Knaus,U.G. (2004). The low molecular weight GTPase RhoA and atypical protein kinase Czeta are required for TLR2-mediated gene transcription. *J. Immunol.* *173*, 507-514.
- Tracey,K.J. and Cerami,A. (1993). Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell Biol.* *9*, 317-343.
- Triantafilou,K., Triantafilou,M., and Dedrick,R.L. (2001a). A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat. Immunol.* *2*, 338-345.
- Triantafilou,K., Triantafilou,M., and Dedrick,R.L. (2001b). Interactions of bacterial lipopolysaccharide and peptidoglycan with a 70 kDa and an 80 kDa protein on the cell surface of CD14+ and. *Hum. Immunol.* *62*, 50-63.
- Tybulewicz,V.L. and Henderson,R.B. (2009). Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 630-644.
- Utsugi,M., Dobashi,K., Ono,A., Ishizuka,T., Matsuzaki,S., Hisada,T., Shimizu,Y., Kawata,T., Aoki,H., Kamide,Y., and Mori,M. (2009). PI3K p110beta positively regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production in human macrophages and dendritic cells and JNK1 plays a novel role. *J. Immunol.* *182*, 5225-5231.
- Uze,G. and Monneron,D. (2007). IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. *Biochimie* *89*, 729-734.
- Van Buul,J.D., Fernandez-Borja,M., Anthony,E.C., and Hordijk,P.L. (2005). Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells. *Antioxid. Redox. Signal.* *7*, 308-317.
- Van,A.L. and Souza-Schorey,C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* *11*, 2295-2322.
- Vanhaesebroeck,B., Welham,M.J., Kotani,K., Stein,R., Warne,P.H., Zvelebil,M.J., Higashi,K., Volinia,S., Downward,J., and Waterfield,M.D. (1997). P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 4330-4335.
- ves-Filho,J.C., de,F.A., Spiller,F., Souto,F.O., and Cunha,F.Q. (2008). The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock* *30 Suppl 1*, 3-9.
- Viboud,G.I., Mejia,E., and Bliska,J.B. (2006). Comparison of YopE and YopT activities in counteracting host signalling responses to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Cell Microbiol.* *8*, 1504-1515.
- Vignali,D.A. and Kuchroo,V.K. (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat. Immunol.* *13*, 722-728.
- Wang,G.G., Calvo,K.R., Pasillas,M.P., Sykes,D.B., Hacker,H., and Kamps,M.P. (2006). Quantitative production of macrophages or neutrophils ex vivo using conditional Hoxb8. *Nat. Methods* *3*, 287-293.
- Wang,L. and Zheng,Y. (2007). Cell type-specific functions of Rho GTPases revealed by gene targeting in mice. *Trends Cell Biol.* *17*, 58-64.
- Watford,W.T., Moriguchi,M., Morinobu,A., and O'Shea,J.J. (2003). The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* *14*, 361-368.

- Weichhart,T., Costantino,G., Poglitsch,M., Rosner,M., Zeyda,M., Stuhlmeier,K.M., Kolbe,T., Stulnig,T.M., Horl,W.H., Hengstschlager,M., Muller,M., and Saemann,M.D. (2008). The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity*. 29, 565-577.
- Welch,H.C., Coadwell,W.J., Stephens,L.R., and Hawkins,P.T. (2003). Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett.* 546, 93-97.
- Wesche,H., Gao,X., Li,X., Kirschning,C.J., Stark,G.R., and Cao,Z. (1999). IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J. Biol. Chem.* 274, 19403-19410.
- Wilkins,A. and Carpenter,C.L. (2008). Regulation of RhoBTB2 by the Cul3 ubiquitin ligase complex. *Methods Enzymol.* 439, 103-109.
- Williams,D.A., Tao,W., Yang,F., Kim,C., Gu,Y., Mansfield,P., Levine,J.E., Petryniak,B., Derrow,C.W., Harris,C., Jia,B., Zheng,Y., Ambruso,D.R., Lowe,J.B., Atkinson,S.J., Dinauer,M.C., and Boxer,L. (2000). Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency. *Blood* 96, 1646-1654.
- Williams,L.M. and Ridley,A.J. (2000). Lipopolysaccharide induces actin reorganization and tyrosine phosphorylation of Pyk2 and paxillin in monocytes and macrophages. *J. Immunol.* 164, 2028-2036.
- Winterbourn,C.C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* 4, 278-286.
- Wölke, S. (2011). Funktionelle Analyse von bakteriellen W-xxx-E Rho GTPasen GEF Mimetika mittels Typ 3 Sekretionssystem von *Yersinia enterocolitica*. Universität Würzburg, Fakultät für Biologie. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Wymann,M.P., Bulgarelli-Leva,G., Zvelebil,M.J., Pirola,L., Vanhaesebroeck,B., Waterfield,M.D., and Panayotou,G. (1996). Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol. Cell Biol.* 16, 1722-1733.
- Xia,C.Q. and Kao,K.J. (2003). Suppression of interleukin-12 production through endogenously secreted interleukin-10 in activated dendritic cells: involvement of activation of extracellular signal-regulated protein kinase. *Scand. J. Immunol.* 58, 23-32.
- Yang,J., Liao,X., Agarwal,M.K., Barnes,L., Auron,P.E., and Stark,G.R. (2007). Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes Dev.* 21, 1396-1408.
- Yi,Z., Lin,W.W., Stunz,L.L., and Bishop,G.A. (2013). Roles for TNF-receptor associated factor 3 (TRAF3) in lymphocyte functions. *Cytokine Growth Factor Rev.*
- Yoshizaki,H., Ohba,Y., Parrini,M.C., Dulyaninova,N.G., Bresnick,A.R., Mochizuki,N., and Matsuda,M. (2004). Cell type-specific regulation of RhoA activity during cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 279, 44756-44762.
- Zhang,J.D., Ruschhaupt,M., Biczok,R. (2012). ddCt method for qRT{PCR data analysis.
- Zhang,X., Goncalves,R., and Mosser,D.M. (2008). The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr. Protoc. Immunol. Chapter 14*, Unit.

Zhou,L., Nazarian,A.A., and Smale,S.T. (2004). Interleukin-10 inhibits interleukin-12 p40 gene transcription by targeting a late event in the activation pathway. *Mol. Cell Biol.* 24, 2385-2396.

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden als Publikationen veröffentlicht oder zur Publikation vorbereitet sowie auf Fachtagungen als Poster präsentiert.

Publikation

Gillmaier,N., Gotz,A., **Schulz,A.**, Eisenreich,W., and Goebel,W. (2012). Metabolic responses of primary and transformed cells to intracellular *Listeria monocytogenes*. PLoS. One. 7, e52378.

Schulz,A., Heesemann,J., Wölke,S.,(2014). Revisiting the Role of the Rho GTPases Rac1 and RhoA on Toll-like Receptor (TLR) induced cytokine responses of murine bone marrow derived Rac1- and RhoA- negative macrophages. In Bearbeitung

Poster

Schulz,A., Heesemann,J., Wölke,S.

Role of Rac1 and RhoA in TLR-Signaling

3. Nationales Yersinia Meeting, 13.-14. Juli 2012, Tübingen, Deutschland

Schulz,A., Heesemann,J., Wölke,S.

Role of Rac1 and RhoA in TLR-Signaling

63. Jahrestagung der DGHM (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie), 30. September-3. Oktober 2012, Hamburg, Deutschland

Wassermann,S., **Schulz,A.**, Heesemann,J., Wölke,S.

Cellular Rho GTPases as modulators for TLR signaling cascades in murine macrophages

4. Nationales Yersinia Meeting, 23.-24. Mai 2014

Danksagung

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die interessante Aufgabenstellung dieser Dissertation, den jederzeit möglichen Meinungsaustausch sowie jeder Menge Ideen und Anregungen.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Michael Hensel für die Übernahme der externen Betreuung, seine Diskussionsbereitschaft und jegliche Unterstützung danken.

Den Mitarbeitern des Tierhauses Jenny Sperling und Saib Hussein danke ich für die Haltung der Versuchstiere, jedes Entgegenkommen und alle Hilfe.

Ganz besonders danke ich allen Mitarbeitern des Max von Pettenkofer-Institutes für jede Art von Beistand, Diskussionen und Ratschläge, aber auch für gegenseitige Aufmunterung und nette Gespräche. Stefan Wölke danke ich für das Einarbeiten in die tierexperimentellen Arbeiten und Diskussionen über Rho GTPasen. Katja Lenk, Kristin Adler und Susanna Roeder, Maximilian Frömberg, Julia Batzilla, Eva Schriefer, Christoph Guggenberger, Beate Czech, Julia Niefnecker, Virginie Nägele, Sara und Tamara Kakoschke, Ombeline Rossier, Bettina Sedlmeier-Erlenfeld, Kristina Gramlich, Emmi und Gabi, Eva Löll, Allison McCormick und Julia Beck, danke für das tolle Arbeitsklima und die schöne Zeit am MvP.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Euch, Mama und Papa, dafür, dass Ihr immer für mich da seid, mir durch Euer Vertrauen und Eure Zusprachen und Unterstützungen so viel ermöglicht habt und immer an mich geglaubt habt.

