

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

pharmazentrum frankfurt  
Institut für Allgemeine Pharmakologie  
Direktor: Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter

**Modulation der Zytokinproduktion durch Interaktionen von IRAK4  
und p47phox mit den TLR-Signalwegen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der theoretischen Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Christina Neske  
Diplom-Biologin  
aus Düsseldorf

Frankfurt am Main, 2015

Dekan: Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. Heinfried H. Radeke

Korreferent: Prof. Dr. Peter Bader

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2015

---

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1</b>	<b>Immunsystem .....</b>	<b>5</b>
2.1.1	Angeborene Immunität .....	5
2.1.2	Erworbene Immunität .....	6
<b>2.2</b>	<b>Dendritische Zellen.....</b>	<b>10</b>
2.2.1	Konventionelle dendritische Zellen .....	11
2.2.2	Plasmazytoide dendritische Zellen .....	11
2.2.3	Langerhans Zellen .....	11
2.2.4	Charakterisierung von DCs .....	12
<b>2.3</b>	<b>Toll-ähnliche Rezeptoren .....</b>	<b>13</b>
2.3.1	TLR4.....	14
2.3.2	TLR9.....	14
<b>2.4</b>	<b>Zytokine und ihre Funktionen.....</b>	<b>15</b>
2.4.1	Interleukin-12 .....	17
2.4.2	Interleukin-6 .....	17
<b>2.5</b>	<b>Rolle von p47phox.....</b>	<b>18</b>
2.5.1	p47phox als Komponente der NADPH-Oxidase .....	18
2.5.2	p47phox und Autoimmunität.....	19
2.5.3	p47phox und TLRs .....	21
<b>2.6</b>	<b>Rolle von IRAK4.....</b>	<b>21</b>
<b>2.7</b>	<b>Zielsetzung der Doktorarbeit.....</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Mauslinien .....</b>	<b>25</b>
3.1.1	Wildtyplinie C57BL/6 .....	25
3.1.2	p47phox <sup>-/-</sup> Mäuse .....	25

---

3.1.3 IRAK4 <sup>-/-</sup> Mäuse.....	25
3.1.4 TRIF <sup>-/-</sup> Mäuse.....	26
<b>3.2 Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>27</b>
3.2.1 Isolierung und Differenzierung muriner primärer Zellen aus dem Knochenmark.....	27
3.2.2 Kultivierung und Stimulation muriner primärer Zellen aus dem Knochenmark.....	28
3.2.3 Elektroporation muriner primärer Zellen aus dem Knochenmark.....	28
3.2.4 Transfektion primärer muriner Knochenmarkszellen mittels einer Kombination aus Elektroporation und Lipofektion.....	30
3.2.5 Transfektion von HEK293T Zellen mit Plasmiden zur Produktion lentiviraler Partikel .....	30
3.2.6 Transduktion von primären murinen Zellen mit lentiviralen Partikeln .....	35
3.2.7 Proteinisolierung aus dem Gesamtzelllysat muriner primärer Knochenmarkszellen.....	36
3.2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	37
3.2.9 Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).....	37
<b>3.3 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>39</b>
3.3.1 DNA-Isolierung aus primären Knochenmarkszellen.....	39
3.3.2 RNA Isolierung.....	39
3.3.3 cDNA Herstellung .....	39
3.3.4 Qualitative PCR.....	40
3.3.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR).....	41
3.3.6 qRT-PCR zur Bestimmung von Lentivirus-RNA-Gehalt .....	42
<b>3.4 Immunologische Methoden.....</b>	<b>43</b>
3.4.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .....	43
3.4.2 Cytometric Bead Array (CBA).....	43

---

3.4.3 SDS-Page.....	44
3.4.4 Western Blot .....	44
3.4.5 Far-Western Blot .....	47
3.4.6 Microscale Thermophoresis .....	48
3.4.7 Durchflusszytometrie.....	49
<b>4 ERGEBNISSE.....</b>	<b>50</b>
<b>4.1 Untersuchungen zur Modulation von IL-12p70 durch IRAK4.....</b>	<b>50</b>
4.1.1 Unterschiedliche Auswirkungen der IRAK4-Defizienz für die TLR9- versus TLR4-abhängige IL-12 Expression .....	51
4.1.2 Regulation der IL-12 Untereinheiten p35 und p40 durch IRAK4.....	52
4.1.3 Einfluss von IRAK4 auf die Regulation von weiterer Zytokine .....	54
4.1.4 Einfluss weiterer IRAK-Proteine auf die IL-12p70 Produktion.....	55
4.1.5 Einfluss anderer Stimuli auf die IL-12p70 Produktion.....	58
4.1.6 Einfluss des IL-1 bzw. IL-33 Signalweges auf die IL-12p70 Produktion....	60
<b>4.2 Charakterisierung von DCs, welche für die p47phox- bzw. IRAK4-abhängige Modulation von IL-12p70 verantwortlich sind .....</b>	<b>62</b>
4.2.1 Durchflusszytometrische Untersuchung der Subpopulationen primärer muriner Knochenmarkszellen.....	62
4.2.2 Einfluss der Expression von Zbtb46 auf die IL-12p70 Produktion in IRAK4 <sup>-/-</sup> , p47phox <sup>-/-</sup> und WT DCs .....	65
<b>4.3 Etablierung von Methoden zum Einbringen von shRNA und siRNA in DCs zur Modulation der p47phox- und IRAK4-Expression .....</b>	<b>66</b>
4.3.1 Einbringen von siRNA mittels Elektroporation .....	66
4.3.2 Transfektion von DCs mittels einer Kombination aus Lipofektion und Elektroporation .....	68
4.3.3 Einbringen von shRNA mit lentiviralen Vektoren .....	69

---

<b>4.4 Untersuchung der molekularen Angriffsorte von p47phox und IRAK4 innerhalb der TLR-Signalkaskade und weiterer Interaktionspartner.....</b>	<b>73</b>
4.4.1 Untersuchungen von Interaktionspartnern im Far-Western Blot.....	73
4.4.2 Untersuchungen von Interaktionspartnern mittels Microscale Thermophoresis .....	75
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>76</b>
<b>5.1 Untersuchungen zur Modulation von IL-12p70 durch IRAK4.....</b>	<b>76</b>
<b>5.2 Charakterisierung von DCs, welche für die p47phox- bzw. IRAK4-abhängige Modulation von IL-12p70 verantwortlich sind .....</b>	<b>82</b>
<b>5.3 Etablierung von Methoden zum Einbringen von shRNA und siRNA in DCs zur Modulation der p47phox- und IRAK4-Expression .....</b>	<b>85</b>
<b>5.4 Untersuchung der molekularen Angriffsorte von p47phox und IRAK4 innerhalb der TLR-Signalkaskade und weiterer Interaktionspartner.....</b>	<b>88</b>
<b>6 AUSBLICK .....</b>	<b>90</b>
<b>7 REFERENZEN .....</b>	<b>92</b>
<b>8 APPENDIX .....</b>	<b>101</b>
<b>8.1 Abkürzungen.....</b>	<b>101</b>
<b>8.2 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>8.3 Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>106</b>
<b>8.4 Publikationen, Kongressbeiträge und Vorträge .....</b>	<b>106</b>
8.4.1 Publikationen .....	106
8.4.2 Posterbeiträge .....	107
8.4.3 Vorträge .....	107
<b>9 DANKSAGUNG.....</b>	<b>109</b>
<b>10 LEBENSLAUF.....</b>	<b>110</b>
<b>11 SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>111</b>

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

p47phox wird als ein in mehreren Strukturen involviertes Protein beschrieben, welches in seiner Funktion einen großen Einfluss auf das Immunsystem nehmen kann und damit zu schweren Erkrankungen führen kann. Wegen der Vielfalt der Interaktionen ist es schwierig die Effekte von p47phox einer bestimmten Wechselwirkung zuzuordnen. Dennoch ist es unserer Arbeitsgruppe gelungen eine negative Rückkopplung von p47phox auf die Produktion von IL-12p70 [1] festzustellen. Ausgehend von dieser Interaktion und der Phosphorylierung von p47phox durch IRAK4 [2], wurde daher in dieser Doktorarbeit der Zusammenhang einer Modulation der IL-12p70-Produktion durch IRAK4 näher untersucht.

Im ersten Teil dieser Dissertation wurde die Modulation der IL-12p70 Produktion durch IRAK4 untersucht. Hierbei kam es zu einer verstärkten Produktion von IL-12p70 nach Stimulation des TLR9 mit CpG in aus dem Knochenmark isolierten IRAK4<sup>-/-</sup> DCs, welche jedoch für die Stimulation des TLR4 mit LPS nicht festgestellt werden kann. Weitere Untersuchungen zeigten, dass der gemessene Anstieg von IL-12p70 nicht auf eine unterschiedliche Regulation der Untereinheiten von IL-12p70 zurückzuführen ist. Auch die Beteiligung der andern IRAK-Proteine scheint nicht die Ursache für diesen Befund zu sein. Ein Anstieg weiterer gemessener Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$ ) weist darauf hin, dass es sich um ein Zusammenspiel der verschiedenen, an der Expression dieser Zytokine beteiligten Signalwege handelt. Im zweiten Teil der Dissertation wurden die DCs charakterisiert, welche für die p47phox- bzw. IRAK4-abhängige Modulation von IL-12p70 verantwortlich sind. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Hemmung der Produktion von IL-12p70 hauptsächlich in einer Subpopulation der DCs, den CD11c positiven Zellen, stattfindet. Im Rahmen dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Größe der Subpopulation der CD11c-positiven DCs zwischen den einzelnen Mauslinien gibt, welche zu einem Unterschied in der durch TLR9-Stimulation induzierten IL-12p70 führen könnte. Eine weitere Überprüfung der primären Knochenmarkszellen mit dem Transkriptionsfaktor Zbtb46 als Marker für cDCs konnte keinen signifikanten Unterschied in der Expression von Zbtb46 zwischen den Mauslinien feststellen. Im dritten Teil dieser Arbeit wurden Methoden zum Einbringen von shRNA und siRNA in DCs aus Wildtyp-Mäusen etabliert, um eine direkte Regulierung der Zielgene *IRAK4* und *Ncf1* zu ermöglichen, dadurch eventuelle systemische Beeinflussungen

auszuschließen und den beobachteten „IRAK4-Effekt“ besser isolieren zu können. Die HBS-Methode mit dem Vektor pcDH1-cop-GFP erwies sich als erfolgreichste Vorgehensweise, mit einer Transfektionseffizienz von 90% und einer Transduktionseffizienz der primären DCs von 40%. Die Transduktion muss nun weiter optimiert und die erfolgreiche Stilllegung der Zielgene durch die im Vektor enthaltene shRNA mittels WB und qRT-PCR gezeigt werden. Da bisher nur unzureichend belegt worden ist, in welcher Weise p47phox in die Signalkaskade der TLR-Signalwege zur Produktion von IL-12p70 eingreift, wurden im letzten Teil der Dissertation die Methoden des far-Westernblots (far-WB) und der Microscale Thermophoresis (MST) zur Identifikation von Interaktionspartnern etabliert. Dabei konnte im far-WB eine Interaktion zwischen humanem rekombinanten (hr) IRAK4 und hrp47phox nachgewiesen werden, jedoch nicht zwischen hrTRAF4 und hrp47phox. In ersten MST Versuchen wurde aus primären murinen WT Knochenmarkszellen isoliertes p47phox und TRAF4 bzw. TRAF6 für die Interaktionsuntersuchung verwendet. Die Messung zeigte, dass es zu einer starken Interaktion zwischen TRAF4 und p47phox kommt und einer im Verhältnis noch stärkeren Affinität zwischen TRAF6 und p47phox.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die in dieser Dissertation gezeigten Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen aus dem Knochenmark isolierten primären DCs von Wildtyp, IRAK4<sup>-/-</sup> und p47phox<sup>-/-</sup> Mäusen ein interessantes Ergebnis darstellt, welches auf eine komplexe Regulation der IL-12p70 Produktion hindeutet. Die Versuchsbedingungen durch die Natur der DCs machten eine Isolation der Ursache bzw. des Zusammenhangs der Regulation der Zytokinproduktion zu einer Herausforderung und warfen viele neue Fragen auf. So kann nicht abschließend beurteilt werden, ob das alleinige Fehlen von IRAK4 zur Erhöhung der IL-12p70 Produktion beigetragen hat, oder ob eventuell eine unterschiedliche Verteilung der Subpopulationen der DCs in IRAK4<sup>-/-</sup> im Vergleich zu Wildtyp oder p47phox<sup>-/-</sup> Mäusen die Ursache ist. Durch die Etablierung einer effizienten Methode zur Transduktion von primären DCs konnte eine Grundlage für die weitere Untersuchung dieser Problematik geschaffen werden. Zusammen mit der Herstellung eines funktionsfähigen p47phox-Antikörpers für eine Ko-Immunopräzipitation und durch die Einführung der MST zur Untersuchung der Proteininteraktionen sollte die Möglichkeit zur genaueren Erforschung der Interaktionspartner gegeben sein, um der Ursache der veränderten Zytokinproduktion bei IRAK4<sup>-/-</sup> und p47phox<sup>-/-</sup> Mäusen weiter auf den Grund zu gehen.

## Abstract

p47phox is described as a protein involved in multiple signaling structures, which in its function can take a big influence on the immune system and can therefore lead to serious diseases. Because of the variety of its functions, it is difficult to attribute the effects of p47phox to a specific interaction. Nevertheless, our group discovered a negative feedback of p47phox on the production of IL-12p70 [1]. On the basis of this interaction and due to the phosphorylation of p47phox by IRAK4 [2], the context of a modulation of IL-12p70 production by IRAK4 was examined in this thesis.

In the first part of this dissertation, the modulation of IL-12p70 production by IRAK4 was examined. An enhanced IL-12p70 production in DCs isolated from the bone marrow of IRAK4<sup>-/-</sup> after stimulation of TLR9 with CpG was observed, which however was absent for the stimulation of TLR4 with LPS. Further investigations showed that the measured increase of IL-12p70 is not due to a different regulation of the subunits of IL-12p70. Also the participation of the other IRAK proteins does not appear to be the cause of this finding. An increase in additionally measured cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$ ) indicates, that there is an interaction between the various signaling pathways involved in the expression of these cytokines.

In the second part of the thesis, the DCs which are responsible for the p47phox- or IRAK4-dependent modulation of IL-12p70 were characterized. Previous studies have shown, that inhibition of IL-12p70 production mainly takes place in a subpopulation of DCs, the CD11c positive cells. In this study, it was observed that there is no significant difference in the size of the subpopulation of CD11c-positive DCs between mice of the different strains, which could lead to a difference in the induced IL-12p70 by TLR9 stimulation. Further testing of primary bone marrow cells with the transcription factor Zbtb46 as a marker for cDCs could not detect any significant difference in the expression of Zbtb46 between mouse strains.

In the third part of this work, methods for the introduction of shRNA and siRNA into DCs from wild-type mice were established, to allow direct regulation of target genes *IRAK4* and *Ncf1*, thereby excluding any systemic influences, to better isolate the observed "IRAK4 effect". The HBS method with the vector pcDH1-cop-GFP was found to be the most successful procedure, with a transfection efficiency of 90% and

transduction efficiency for primary DCs of 40%. The transduction must be further optimized and the successful silencing of the target genes by means of the shRNA vector has to be shown in WB and qRT-PCR.

Since it has only been inadequately established in which way p47phox engages in the TLR signaling pathways for the production of IL-12p70, the methods of far-Western blotting (far-WB) and Microscale Thermophoresis (MST) were established in the last part of this thesis, to identify interaction partners of IRAK4 and p47phox. An interaction between human recombinant (hr) IRAK4 and hrp47phox could be detected in the far-WB, but not between hrTRAF4 and hrp47phox. For the first MST experiments p47phox, TRAF4 and TRAF6 isolated from primary murine WT bone marrow cells were used for interaction studies. The measurements showed that there is a strong interaction between TRAF4 and p47phox and an even greater relative affinity between TRAF6 and p47phox.

In summary it can be said that the differences in cytokine expression in primary DCs isolated from the bone marrow from wild-type, IRAK4<sup>-/-</sup> and p47phox<sup>-/-</sup> mice shown in this thesis is an interesting result, which suggests a complex regulation of IL-12p70 production. The experimental conditions, due to the nature of DCs, made an isolation of the cause or the context of the regulation of cytokine production a challenge and raised many new questions. It cannot be conclusively evaluated whether the sole absence of IRAK4 contributed to the increased IL-12p70 production, or whether perhaps a different distribution of subpopulations of DCs in IRAK4<sup>-/-</sup> compared to wild-type or p47phox<sup>-/-</sup> mice is the cause. By establishing an efficient method for the transduction of primary DCs, a basis for further study of these problems could be provided. Along with the production of a functional p47phox antibody for co-immunoprecipitation and by the introduction of MST to study protein interactions, opportunities for a closer investigation of the interaction partners should be given, to examine and solve the cause of the altered cytokine production in IRAK4<sup>-/-</sup> and p47phox<sup>-/-</sup> mice.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Immunsystem

#### 2.1.1 Angeborene Immunität

Die erste Verteidigung des Körpers gegen eindringende Pathogene ist das angeborene Immunsystem. Hierbei handelt es sich um eine genetisch determinierte Immunantwort, die jeder Mensch von Geburt an besitzt und die sich in ihrer Wirkweise ein Leben lang nicht verändert. Wichtigste Komponenten der nicht adaptiven Immunantwort gegen eindringende Pathogene sind als erste Barriere die Haut und Schleimhäute und als zweite Barriere phagozytische weiße Blutzellen (Leukozyten) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), das Komplementsystem, Typ 1 Interferone und andere pathogenschädigende Mechanismen der Entzündungsreaktion.

Die **Haut und Schleimhäute** des Körpers erfüllen zwei Funktionen in der Abwehr von Pathogenen. Zum einen dienen sie als physikalische Barriere, zum anderen werden durch das Zusammenspiel von geringem pH-Wert, Tränenflüssigkeit, Talg- bzw. Sekretabsonderungen und den darin enthaltenen antimikrobiellen Proteinen Pathogene am Eindringen in den Körper gehindert und zerstört.

Sind Pathogene in den Körper eingedrungen kommt die zweite Barrierefunktion der angeborenen Immunität zum Tragen. Verschiedene Arten von **Leukozyten** nehmen die Pathogene auf und vernichten diese (Phagozytose). Die größte Untergruppe der Leukozyten stellen mit 60 % die Neutrophilen dar, weitere Untergruppen sind die Makrophagen und Eosinophilen. Eine weitere wichtige Rolle in der nicht adaptiven Abwehr spielen die NK-Zellen, die inzwischen zu einer Familie von „innate“ Lymphozyten gezählt werden. Im Unterschied zu den vorher behandelten Untergruppen greifen sie jedoch eindringende Pathogene nicht direkt an, sondern zerstören infizierte oder entartete Zellen des eigenen Körpers.

Das **Komplementsystem** besteht aus mehr als 20 verschiedenen Proteinen, die in einer Kaskade von Aktivierungsschritten zur Lyse des eingedrungenen Pathogens führen. Zwischenschritte bei dieser Reaktion sind die Anlockung weiterer Phagozyten in das infizierte Gewebe, die Erhöhung der Phagozytose und das Initiieren einer Entzündungsreaktion.

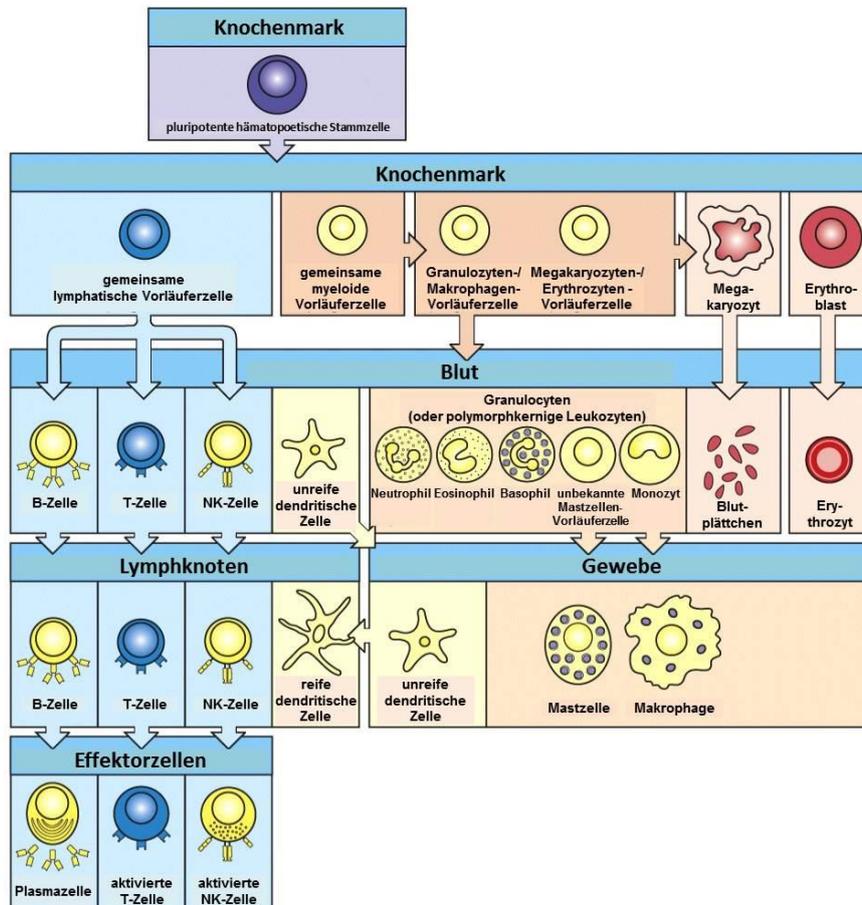
Hervorgerufen durch Gewebeschäden oder das Eindringen von Mikroorganismen, wird die **Entzündungsreaktion** durch die Ausschüttung von Signalstoffen, wie Histamin, Prostaglandin-E2 und Lipidmediatoren, in Gang gesetzt. Blutgefäße erweitern sich und werden durchlässiger, Lymphflüssigkeit dringt aus dem Blut in die betroffene Region ein. Neben einer erhöhten Dilatation und Permeabilität der Kapillaren kommt es durch die Aktivierung des lokalen Endothels zu vermehrtem Einwandern von Phagozyten in die betroffene Region und damit zu einer effektiveren Bekämpfung des eingedrungenen Erregers.

### 2.1.2 Erworbene Immunität

Im Gegensatz zur angeborenen Immunität steht die erworbene oder adaptive Immunität. Hierbei handelt es sich um eine spezifische und optimal angepasste Antwort auf vielfältige Antigene, welche Strukturen sind, die in den Körper eindringen, dort als körperfremd erkannt werden und eine Immunantwort auslösen. Zusätzlich entwickelt der Körper ein Gedächtnis für die Antigene, mit denen er bereits in Kontakt getreten ist und kann so eine schnellere und effizientere Abwehr bei erneutem Kontakt mobilisieren. Wichtig für das korrekte Arbeiten des adaptiven Immunsystems ist eine intakte Selbst-Fremd-Erkennung des Körpers. Fehler bei der Erkennung von Eigen- und Fremdstrukturen können zu Autoimmunkrankheiten führen.

Das adaptive Immunsystem gliedert sich in zwei Arme: die humorale und die zellvermittelte Immunität. Die **humorale Immunität** wird getragen von zirkulierenden Antikörpern, die von B-Lymphozyten/Plasmazellen produziert werden. Zusammen mit dem Komplementsystem wirken die Antikörper hauptsächlich gegen Toxine, freie Bakterien und Viren in den Körperflüssigkeiten. Auf der anderen Seite steht die **zellvermittelte Immunantwort**, welche auf der Effektorfunktion zirkulierender Immunzellen (T-Lymphozyten) beruht, die gegen bereits durch Bakterien und Viren befallene Zellen, aber z.T. auch indirekt durch Aktivierung von Makrophagen, gegen Pilze, Protozoen und Parasiten sowie transplantiertes Gewebe vorgehen.

Für die adaptive Immunantwort spielen zwei verschiedene Zelltypen, die B- und T-Zellen, eine große Rolle. Diese beiden Zelltypen gehören zu den Lymphozyten und reifen aus den gleichen Lymphozytenvorläufern heran. Reife B- und T-Zellen sind besonders in Lymphknoten, der Milz und anderen lymphatischen Organen zu finden, wo die Wahrscheinlichkeit groß ist, auf ein hohes Vorkommen an Antigenen zu treffen.



**Abb. 1 Zelluläre Bestandteile des Blutes**  
(angepasst aus [9])

B- und T-Zellen tragen beide Antigen-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Der B-Zellrezeptor ist ein membrangebundener Antikörper, welcher spezifisch für ein bestimmtes Antigen und in mehreren Kopien auf der Zelloberfläche vorhanden ist. Der Antigenrezeptor einer T-Zelle ist einem Antikörper strukturell sehr ähnlich und das Antigen wird ebenso spezifisch erkannt wie bei den B-Zellen. Erfolgt die Bindung eines Antigens an einen Rezeptor auf der Oberfläche eines Lymphozyten zusammen mit bestimmten kostimulatorischen Signalen, führt dies zur Teilung und Differenzierung des entsprechenden Lymphozyten, wodurch eine Effektorzelle entsteht.

Bei der **zellvermittelten Immunantwort** gibt es zwei Unterklassen von Effektorzellen, zytotoxische T-Zellen ( $T_C$ -Zellen) und T-Helferzellen ( $T_H$ -Zellen).  $T_C$ -Zellen töten infizierte Zellen und Tumorzellen im Körper ab,  $T_H$ -Zellen schütten Signalstoffe (Zytokine) aus, welche benachbarte Zellen beeinflussen und die Immunantwort von B- und T-Zellen regulieren. Zusammen mit der Bildung von Effektorzellen beim ersten Kontakt mit einem neuen Antigen, der sogenannten primären Immunantwort, werden

ebenfalls Gedächtniszellen gebildet. Diese überleben sehr lang und befähigen den Körper bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen eine schnellere, adaptive Immunantwort einzuleiten.

Die strikte Trennung zwischen humoraler und zellvermittelter Immunantwort ist schwierig, da die  $T_H$ -Zellen ebenfalls in der humoralen Abwehr eine große Rolle spielen. Die Aktivierung von B-Zellen durch die direkte Bindung eines Antigens an den B-Zellrezeptor stellt nur den ersten Schritt der humoralen Abwehr dar. Ein zweiter Schritt involviert  $T_H$ -Zellen und antigenpräsentierende Zellen und führt ebenfalls zur Ausschüttung von Antikörpern.

Bei antigenpräsentierenden Zellen (APCs) handelt es sich um Makrophagen und dendritische Zellen (DCs). DCs verbinden das angeborene mit dem erworbenen Immunsystem [3] und haben als einzige Zellen die Fähigkeit naive T-Zellen zu aktivieren [4]. DCs besitzen eine geringere Phagozytosekapazität als Makrophagen, sind aber effizienter in der Antigenprozessierung und verfügen über kostimulatorische Oberflächenmoleküle, welche zusammen mit der Sezernierung von Zytokinen zur optimalen Aktivierung von T-Zellen führt. Damit sind DCs die effektivsten APCs. Im Vergleich dazu stehen die Makrophagen, die ebenfalls in der Lage sind, eindringende Pathogene zu phagozytieren und deren Fragmente an der Zelloberfläche zu präsentieren. Jedoch sind Makrophagen darauf ausgerichtet, große Mengen von Pathogenen zu internalisieren und anschließend zu vernichten, so dass ein Hauptaugenmerk nicht auf der Antigenprozessierung und –präsentation liegt. Zusätzlich spielen Makrophagen eine wichtige Rolle in der Sekretion von Enzymen und reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies zur extrazellulären Bekämpfung von eindringenden Pathogenen und bei der Beseitigung körpereigener, gealterter Zellen.

Wird ein eindringendes Pathogen von einem Makrophagen oder einer DC phagozytiert und endosomal degradiert, können verschiedene Fragmente des Pathogens auf Haupthistokompatibilitäts-Klasse II-Komplexen (MHC-II-Komplex) an der Zelloberfläche präsentiert werden. Der Makrophage bzw. die DC ist nun eine antigenpräsentierende Zelle und der Komplex aus MHC-II und einem spezifischen Antigen kann von T-Zellen durch einen spezifischen T-Zellrezeptor (TCR) erkannt werden. Neben der Erkennung des Antigens durch den TCR sind weitere kostimulatorische Signale nötig, um die T-Zelle zu aktivieren. Der CD4-Rezeptor

(„cluster of differentiation 4“), welcher eine Affinität zu einer bestimmten Region des MHC-II Komplexes besitzt, verstärkt die Bindung von T<sub>H</sub>-Zelle und APC während der Antigenpräsentation. Außerdem erfolgt eine Bindung zwischen dem von APCs exprimiertem CD80 und CD86 mit dem Rezeptor CD28 auf den T-Zellen und zwischen CD40 und CD40-Ligand. Durch die Kostimulation schüttet die T-Zelle nun vermehrt IL-2 aus, welches als Wachstumsfaktor für T-Zellen fungiert und sie zur Proliferation anregt. Die T-Zelle ist nun aktiviert und proliferiert zu einem T<sub>H</sub>-Zellklon, der auf diese spezielle Kombination aus MHC-II-Komplex und Antigen spezialisiert ist. Nach der Aktivierung setzt die T<sub>H</sub>-Zelle Zytokine frei, welche die B-Zellen zur Proliferation stimulieren, die auf das gleiche Antigen spezialisiert sind. Zusätzlich kann die T<sub>H</sub>-Zelle ihren MHC-II-Antigen-Komplex einer B-Zelle präsentieren und dadurch die gebundene B-Zelle stimulieren, Plasma- und Gedächtniszellen zu bilden. Außerdem können B-Zellen Fragmente von dem an die B-Zellrezeptoren gebundenen Antigen aufnehmen und auf einem eigenen MHC-II-Komplex präsentieren. Dieser Komplex wird dann von weiteren T<sub>H</sub>-Zellen erkannt und verstärkt die Immunreaktion. Sowohl Makrophagen und DCs als auch B-Zellen können als APC fungieren, allerdings nehmen Makrophagen und DCs Pathogene unspezifisch auf und präsentieren deren Antigen-Peptidfragmente, während jede einzelne B-Zelle nur ein spezifisches Antigen erkennt und dieses Antigen präsentieren kann.

T-Zellen sind im Gegensatz zu B-Zellen nicht in der Lage freie Antigene zu erkennen und zu binden. Sie erkennen ausschließlich gebundene Antigene auf körpereigenen Strukturen, wie im Vorangegangenen erläutert. Hierbei handelt es sich um APCs, die Antigene auf MHC-II-Komplexen präsentieren, welche dann von T<sub>H</sub>-Zellen erkannt werden. T<sub>C</sub>-Zellen erkennen den Komplex aus MHC-I und Antigen, welcher auf allen kernhaltigen Körperzellen vorkommt. Analog zum CD4-Rezeptor bei T<sub>H</sub>-Zellen besitzen T<sub>C</sub>-Zellen einen CD8-Rezeptor, welcher an eine Region des MHC-I-Komplexes bindet. Dadurch wird die Bindung von T<sub>C</sub>-Zelle an infizierten Körperzellen stabilisiert und die T<sub>C</sub>-Zelle kann über Granzym B und Perforin oder FAS-Liganden direkt (Lyse) oder indirekt (Apoptose) den Tod der infizierten Zelle herbeiführen.

Zusätzlich zu der strikten Trennung der Präsentation von Antigenen exogener Herkunft auf MHC-II-Komplexen und intrazellulärer Antigene auf MHC-I-Komplexen, besteht die Möglichkeit der Kreuzpräsentation [5]. Hierbei werden exogene Antigene durch APCs auf MHC-I-Komplexen präsentiert, welches zur Abtötung durch CD8<sup>+</sup> T<sub>C</sub>-Zellen

führt. Dieser Mechanismus wurde bei DCs [6], aber auch in Makrophagen [7] beobachtet und stellt die Weichen für die Entscheidung zur Toleranz oder Immunität.

T<sub>H</sub>-Zellen lassen sich in mehrere Untergruppen aufteilen, von denen die klassischen Subtypen T<sub>H1</sub> und T<sub>H2</sub> bereits Ende der 80er Jahre beschrieben wurden [8]. T<sub>H1</sub>-Zellen sind durch ihre Produktion von IFN- $\gamma$  charakterisiert, welches zur Stimulation von Makrophagen führt und einer Verbesserung der Lyse intrazellulärer Bakterien. Dagegen kontrollieren T<sub>H2</sub>-Zellen hauptsächlich die Aktivierung von B-Zellen durch die Produktion von IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13. Die T<sub>H</sub>-Zellen wurden in den letzten Jahren durch die Subtypen T<sub>H17</sub> und T<sub>reg</sub> erweitert, wobei T<sub>H17</sub>-Zellen hauptsächlich im Bereich der Autoimmunität und Entzündungsreaktion bekannt sind [9] und T<sub>reg</sub>-Zellen der Regulation der Autoimmunität [10] zugeschrieben werden.

## 2.2 Dendritische Zellen

Wie vorangehend beschrieben, handelt es sich bei DCs um äußerst effiziente APCs. Um aus unreifen DCs reife APCs zu machen, ist eine vollständige Aktivierung der Zellen erforderlich. Diese Aktivierung wird durch verschiedene Signale beeinflusst. Zum einen können Mustererkennungs-Rezeptoren (PRRs), welche sich auf der Oberfläche der Zellen befinden, bestimmte Strukturen von Antigenen, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs), unspezifisch binden. Die Bindung von PAMPs führt zur Initiierung einer Signalkaskade, die in der Expression von bestimmten Signalstoffen (Zytokine) resultieren. Des Weiteren spielt die Balance zwischen anti- und proinflammatorischen Zytokinen und die durch T-Zellen initiierten Signale eine Rolle in der Aktivierung von DCs. Die Reifung der DCs geht einher mit einer Umordnung des Zytoskeletts, welches zu einer morphologischen Veränderung führt, und zu einer Reduktion der Phagozytosefähigkeit. Es werden vermehrt peptidbeladene MHC-I- und MHC-II-Komplexe, kostimulatorische Moleküle der B7 Superfamilie, wie CD86 und CD80, und den sog. Reifemarker CD83 an der Oberfläche rekrutiert. Die reifen DCs wandern als APCs in die T-Zell-Region der Lymphknoten ein [4,11].

DCs werden kontinuierlich aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) im Knochenmark produziert und mit dem Blut zu den peripheren Geweben transportiert. Aufgrund ihrer Morphologie, unterschiedlichen Funktion, Genexpression und

Oberflächenmarker können DCs in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden (Abb. 2).

### **2.2.1 Konventionelle dendritische Zellen**

Als erste DC-Untergruppe wurden die konventionellen oder klassischen DCs (cDCs) von Ralph Steinmann entdeckt [12] und als selbständige Zelllinie definiert. Bei cDCs handelt es sich um stark phagozytierende Zellen, die auf das Prozessieren und Präsentieren von Antigenen spezialisiert sind. Durch ihre kurze Halbwertszeit von 3-5 Tagen werden sie kontinuierlich aus Knochenmarksvorläuferzellen ersetzt und migrieren durch afferente Lymphbahnen zu den peripheren Geweben. Konventionelle DCs besitzen von allen DC-Untergruppen das höchste Potential, naive T-Zellen zu stimulieren und initiieren die adaptive Immunantwort in den T-Zellregionen der sekundären lymphatischen Organe. Diese Zellen existieren in zwei Stadien, den unreifen und reifen cDCs, welche sich durch die Menge an exprimiertem MHC-I- und MHC-II-Komplex auf der Oberfläche unterscheiden. Konventionelle DCs können in zwei Subklassen unterteilt werden, die jeweils unterschiedliche Zielzellen stimulieren. Die cDCs mit einem hohen Anteil an CD8 $\alpha$ -Oberflächenrezeptor haben eine erhöhte Fähigkeit, Antigen auf MHC-I-Komplexen für CD8 $\alpha$ -positive T-Zellen zu präsentieren. Im Gegenzug stimulieren CD4-positive cDCs effizienter CD4-positive T-Zellen über an den MHC-II-Komplex gebundene Antigene.

### **2.2.2 Plasmazytoide dendritische Zellen**

Im Gegenzug zu den cDCs handelt es sich bei plasmazytoiden DCs (pDCs) um Zellen mit geringerer phagozytischer Aktivität, die viele Charakteristika von Lymphozyten [13] aufweisen. Sie entstehen während der Reifung im Knochenmark aus den gleichen Vorläuferzellen wie cDCs, unterscheiden sich aber stark durch ihre sphärische Morphologie und ihre Fähigkeit, nach Kontakt zu Viren große Mengen Typ I Interferon zu sekretieren. Durch die große Fluktuation von MHC-II-Komplex auf ihrer Oberfläche sind diese Zellen schlechter in der Lage, CD4-positiven T-Zellen Antigene zu präsentieren [14].

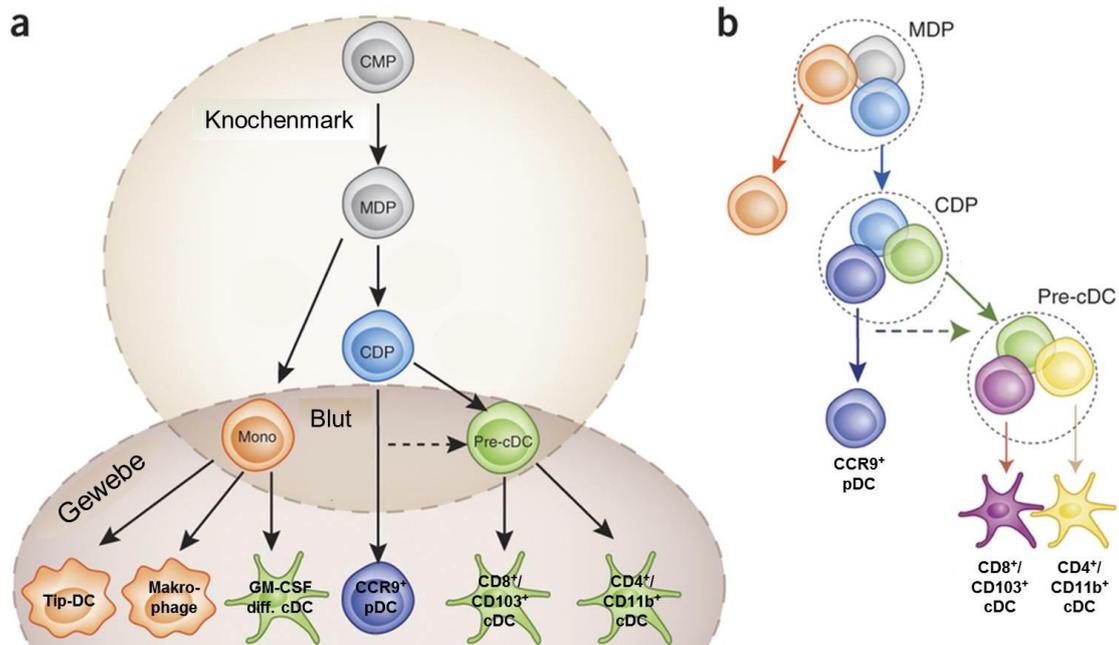
### **2.2.3 Langerhans Zellen**

Langerhans Zellen (LC) sind APCs, die in der Epidermis der Haut angesiedelt sind, um dort eindringende Pathogene zu phagozytieren und die dabei entstehenden Antigene in

den Lymphknoten T-Zellen zu präsentieren. LCs werden als eine Untergruppe von dendritischen Zellen angesehen, allerdings weisen sie viele Gemeinsamkeiten mit geweberesidierenden Makrophagen auf, da sie nach der Aufnahme von Pathogenen deutlich schlechter zum Lymphknoten migrieren als cDCs und ihr Genexpressionsprofil dem der Makrophagen ähnelt[15,16].

#### **2.2.4 Charakterisierung von DCs**

Verschiedene Unterklassen wie auch die Vielzahl an unterschiedlichen APCs machen eine genaue Charakterisierung von DCs unumgänglich. Hierzu wurden in der Vergangenheit sowohl die Morphologie und anatomische Verteilung, als auch Oberflächenmarker herangezogen. Aufgrund der Vereinfachung durch die Durchflusszytometrie bieten sich Oberflächenmarker als zuverlässige Identifikationsquelle jedoch an und so wurde der Oberflächenmarker CD11c lange Zeit als Hauptidentifikationsmerkmal für DCs angesehen. Mittlerweile ist bekannt, dass CD11c auch auf anderen Immunzellen vorhanden ist und daher nicht als alleiniger Marker für DCs herangezogen werden kann [17,18]. Dies ist nicht nur für CD11c bekannt, sondern auch für andere Oberflächenmarker und daher ist momentan kein Oberflächenmarker bekannt, der es ermöglicht DCs klar von anderen Zellen mit myeloidem oder lymphoidem Ursprung zu unterscheiden. Aus diesem Grund greift man auf eine Kombination von Oberflächenmarkern, Morphologie, anatomischer Verteilung und Genexpressionsstudien zurück, um die verschiedenen DC-Untergruppen zu identifizieren. Hierbei ist besonders der Transkriptionsfaktor Zbtb46 zu nennen, für den gezeigt wurde, dass er spezifisch von cDC exprimiert wird, jedoch nicht in pDCs oder anderen myeloiden Zellen [16,19,20]. Diese Studien zu Transkriptionsfaktoren und Genexpression in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von DCs führten auch zu der in Abb. 2 dargestellten Hypothese zur Abstammung der einzelnen DC-Untergruppen und der Abgrenzung dieser zu Makrophagen.



**Abb. 2 Unterscheidung von DC-Subpopulationen**

a) CMP: gemeinsame myeloide Vorläuferzelle, MDP: Makrophagen-DC Vorläuferzelle, CDP: gemeinsame DC Vorläuferzelle, Mono: Monozyt, Pre-cDC: cDC Vorläuferzelle; b) Heterogenität von DC-Vorläuferpopulationen (gestrichelte Kreise) angepasst aus [11]

## 2.3 Toll-ähnliche Rezeptoren

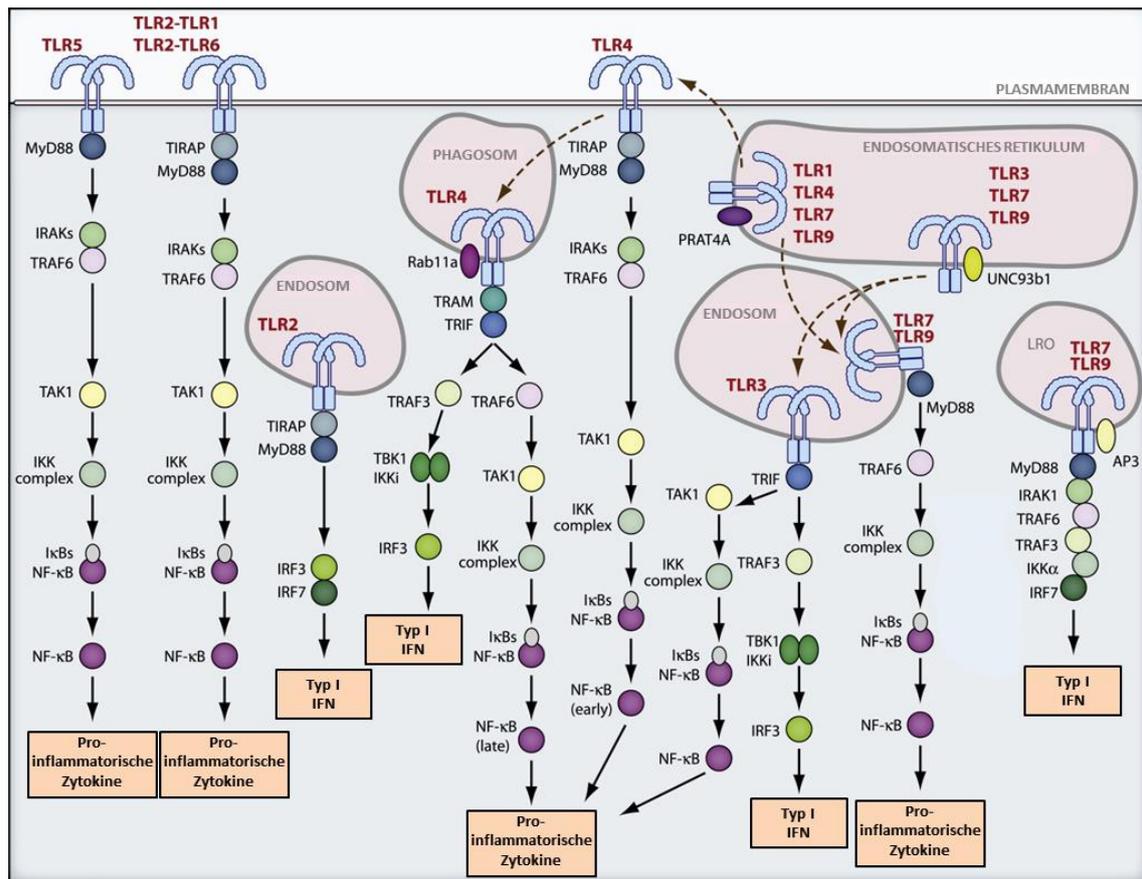
Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs) sind transmembranäre Rezeptoren auf APCs, die PAMPs erkennen. Sie bestehen aus einer leucinreichen Ektodomäne zur Erkennung der PAMPs, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Toll-Interleukin 1-Rezeptor (TIR)-Domäne zur Weiterleitung des Signals. Bisher sind 13 TLRs bei Mäusen [21] und 10 TLRs bei Menschen bekannt, wobei jeder TLR ein bestimmtes PAMP erkennt und eine differenzierte Signalkaskade auslöst. Zu den PAMPs gehören sowohl Strukturen von Lipiden, Lipoproteinen, Proteinen, Parasiten und Pilzen sowie DNA bzw. RNA von verschiedenen Bakterien und Viren. Die Erkennung dieser PAMPs erfolgt sowohl an der Plasmamembran, wie auch in Endosomen oder Lysosomen. Nach der Aktivierung durch den entsprechenden Liganden verändern TLRs ihre Konformation und rekrutieren Adaptormoleküle, um die spezifischen Signalkaskaden anzuschalten, welche zur Expressierung eines oder mehrerer Transkriptionsfaktoren führt. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich TLR4 und TLR9 näher betrachtet.

### 2.3.1 TLR4

Beim Toll-ähnlichen Rezeptor 4 (TLR4) handelt es sich um einen an der Plasmamembran lokalisierten Rezeptor, der hauptsächlich Lipopolysaccharide (LPS) von Gram-negativen Bakterien erkennt. Nach seiner Aktivierung rekrutiert TLR4 zuerst die Adaptormoleküle „TIR domain containing adaptor protein“ (TIRAP) und „Myeloid differentiation primary response gene 88“ (MyD88) zur frühen Aktivierung von „Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells“ (NF- $\kappa$ B) und „Mitogen-activated protein kinases“ (MAPK), danach folgen die Endozytose und die Verlagerung des Rezeptors in das Endosom. Dort werden die Adaptermoleküle „TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ “ (TRIF) und „TRIF-related adaptor molecule“ (TRAM) für die Aktivierung von „Interferon regulatory factor 3“ (IRF3) und Spätphasen NF- $\kappa$ B und MAPK rekrutiert (Abb. 3). TLR4 rekrutiert als einziger TLR alle vier direkten Adaptormoleküle und ist so in der Lage, sowohl MyD88-abhängige wie auch TRIF-abhängige Signalkaskaden zu beeinflussen.

### 2.3.2 TLR9

TLR9 ist nicht an der Plasmamembran zu finden, sondern in erster Linie auf der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Nach Kontakt zu einem Pathogen wird der Rezeptor vom ER zu Endolysosomen rekrutiert, wo er einer Prozessierung durch Proteasen unterläuft und anschließend die Bindung an den Liganden stattfindet. Die Liganden für TLR9 sind CpG-Oligonukleotide aus bakterieller und viraler DNA, welche sowohl durch Endozytose aber auch durch aktives Eindringen von Viren in die Zelle zu den TLR9-enthaltenen Endolysosomen gelangen. Nach der Aktivierung rekrutiert TLR9 das Adaptormoleküle MyD88 und initiiert die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen und Typ I Interferon.



**Abb. 3 Die TLR-Signalwege und assoziierte Signalkomponenten**  
(angepasst aus [35])

## 2.4 Zytokine und ihre Funktionen

Zytokine sind kleine Proteine (< 25 kD), die von verschiedenen Zellen im Körper freigesetzt werden und ihre Wirkung durch Bindung an spezifische Rezeptoren auf den Zielzellen entfalten. Zytokine können autokrin, parakrin oder endokrin wirken und regulieren die Differenzierung und Proliferation der Zielzellen. Es werden fünf Hauptgruppen von Zytokinen unterschieden: Chemokine, Tumornekrosefaktoren, Interferone, koloniestimulierende Faktoren und Interleukine.

Bei Chemokinen handelt es sich um Zytokine, die bei in der Nähe vorhandenen Zellen eine chemotaktisch gerichtete Bewegung bewirken. Sie binden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der Zielzellen, hauptsächlich Leukozyten, aber auch andere Effektorzellen aus dem Blut und bewirken ein Einwandern dieser Zellen zum Infektionsherd.

Die Hauptaufgabe von Tumornekrosefaktoren (TNF), welche größtenteils durch Makrophagen produziert werden, ist die Regulation der Aktivität verschiedener

Immunzellen. TNFs spielen eine Rolle bei apoptotischem Zelltod, lokalen und systemischen Entzündungen, sowie Fieber, Kachexie und Tumorregression. Bisher wurden 19 verschiedenen Zytokine dieser Familie entdeckt, von diesen wurden TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  bisher am intensivsten erforscht.

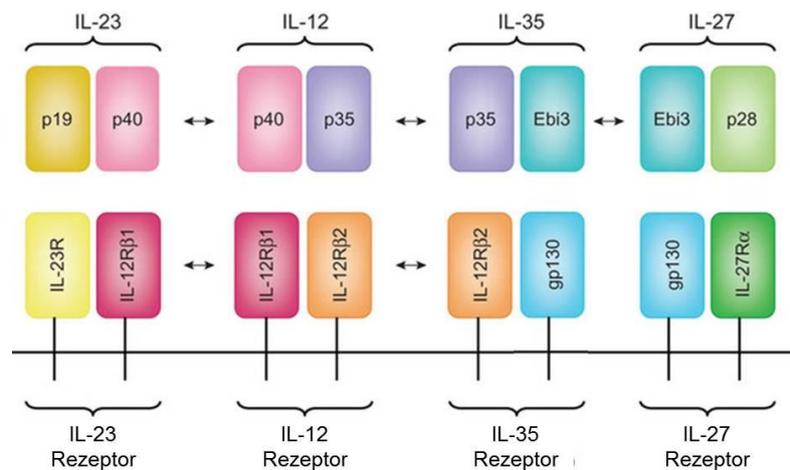
Interferone (IFN) sind antivirale Proteine, die von Zellen als Reaktion auf eine Virusinfektion gebildet werden. Sie erzeugen bei nicht infizierten Zellen eine gewisse Resistenz gegenüber der Virusreplikation, bewirken einen Anstieg der Expression von MHC-I-Komplexen auf der Zelloberfläche und veranlassen damit eine vermehrte Präsentation von Antigenen zur verbesserten Abtötung infizierter Zellen durch CD8-positive T<sub>C</sub>-Zellen und NK-Zellen. Interferone werden in zwei Gruppen aufgeteilt: die Typ-I-Interferone, IFN- $\alpha$  und - $\beta$ , und das Typ-II-Interferon, IFN- $\gamma$ . Hauptproduzenten von Typ-I-IFN sind DCs und Fibroblasten. Die Ausschüttung der Typ-I-IFN erfolgt hauptsächlich zum Schutz vor einer Virusinfektion, wobei die Induktion von IFN- $\gamma$  vor allem immunregulatorisch wirkt.

Die Funktion von koloniestimulierenden Faktoren (CSF), einer Gruppe von Wachstumsfaktoren, ist die Vermehrung und Reifung von Knochenmarkstammzellen. Sie werden in Stromazellen des Knochenmarks, Fibroblasten, Makrophagen, T- und B-Zellen sowie Endothelzellen gebildet und können teilweise auch zur Steigerung der Aktivität ausdifferenzierter hämatopoetischer Zellen beitragen.

Interleukine (IL) werden von verschiedenen Zellen des Immunsystems ausgeschüttet, um bei anderen Zellen Wachstum, Differenzierung und Proliferation zu induzieren oder zu inhibieren. Es handelt sich um eine Gruppe von Signalstoffen, die sehr stark variierende Effekte bei den Zielzellen hervorrufen kann, so dass jedes Interleukin für seine Funktion einzeln betrachtet werden muss. In meiner Arbeit wurde hauptsächlich die Produktion von IL-12 und IL-6 näher untersucht.

### 2.4.1 Interleukin-12

Interleukin-12 (IL-12) gehört zu einer heterodimeren Zytokinfamilie mit vier verschiedenen Zytokinen: IL-12, IL-23, IL-27 und IL-35. Jedes der vier Zytokine dieser Familie besteht aus einer von drei möglichen  $\alpha$ -Untereinheiten (p19, p28 und p35) und einer von zwei möglichen  $\beta$ -Untereinheiten (p40 oder Ebi3). IL-12 setzt sich aus der  $\alpha$ -Untereinheit p35 und der  $\beta$ -Untereinheit p40 zusammen, welche es sich mit IL-35 bzw. IL-23 teilt und wird in seiner heterodimeren Form als IL-12p70 bezeichnet (Abb. 4). Der Rezeptor für IL-12 besteht ebenfalls aus zwei Untereinheiten, IL-12R $\beta$ 2 und  $\beta$ 1, welche sich nach dem Kontakt der Zielzellen zu IL-12 zusammenlagern. IL-12 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches hauptsächlich von DCs [22,23], aber auch von Makrophagen [24–26] nach dem Kontakt zu Pathogenen gebildet wird. Es führt durch eine positive Rückkopplung zur Produktion von IFN- $\gamma$  durch T-Zellen, wodurch weitere APCs zur Produktion von IL-12 angeregt werden und die Immunantwort sich in Richtung T<sub>H1</sub>-Zellen verlagert.



**Abb. 4 Interleukin-12 Zytokinfamilie**  
(angepasst aus [21])

### 2.4.2 Interleukin-6

Bei Interleukin-6 (IL-6) handelt es sich um ein überwiegend pro-inflammatorisches Zytokin, dem als Serumfaktor auf die Leber wirkend auch eine anti-inflammatorische Funktion zugesprochen wird [27]. Es wird vor allem von T-Zellen, mononukleären Phagozyten, sowie von anderen Zellen (Fibroblasten, Zellen des zentralen Nervensystems), aber auch autokrin in der Leber und Niere gebildet. IL-6 besteht aus

184 Aminosäuren in vier  $\alpha$ -Helixstrukturen und kommt in verschiedenen Isoformen vor. Es kann sowohl an einen membrangebundenen Rezeptor, welcher aus einem IL-6 bindenden Protein (IL-6R $\alpha$ ) und aus einer signalübertragenden Kette (gp130) besteht, als auch an einen löslichen Rezeptor (sIL-6) binden. Da viele Zellen gp130 enthalten und der Komplex aus IL-6 und IL-6R $\alpha$  an dieses binden kann, kommt dadurch ein großes Wirkspektrum zustande. Im Immunsystem wirkt IL-6 als Wachstumsfaktor in der frühen Hämatopoese und für aktivierte B-Zellen. Außerdem ist es für die Akutphaseantwort in der Leber verantwortlich und spielt eine Rolle bei der Chronifizierung akuter Entzündungsreaktionen.

## 2.5 Rolle von p47phox

### 2.5.1 p47phox als Komponente der NADPH-Oxidase

Die professionellen Phagozyten des Immunsystems nehmen Pathogene auf und schließen sie in ein Phagosom ein, um sie durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zerstören zu können. Für die Produktion von ROS innerhalb des Phagosoms ist die NADPH (Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat)-Oxidase (NOX) zuständig, welche 1978 von AW. Segal et al. entdeckt wurde und in der neuen Terminologie als NOX2 identifiziert wird. NOX2 findet man hauptsächlich in Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen und Eosinophilen, aber auch andere Gewebe exprimieren NOX2. Es handelt sich dabei um einen Komplex aus dem membranständigen Flavozytochrom  $b_{558}$ , bestehend aus den Untereinheiten gp91phox und p22phox, und einem zytosolischen Komplex aus p40phox, p47phox und p67phox, sowie die GTPasen (Guaninnukleotid-bindendes Enzym) Rac1 oder Rac2. Der Komplex aus p40phox, p47phox und p67phox liegt in einer autoinhibierten Form im Zytoplasma vor und ändert seine Konformation nach der Aktivierung durch Phagozytose eines Pathogens. Dabei spielt p47phox eine tragende Rolle, da es durch Phosphorylierung aktiviert wird und die organisierende Untereinheit des Trimers darstellt, welche die Bindung an das Flavozytochrom  $b_{558}$  ermöglicht [28]. Die Bindung von p47phox an Flavozytochrom lässt wiederum p67phox an die Untereinheit gp91phox binden [29] und nach der Zusammenlagerung mit GTP-gekoppeltem Rac1 oder 2 wird so eine Elektronentransportkette aktiviert. Hierdurch kann ein Elektron über die NOX transportiert werden, wobei NADPH zu NADP<sup>+</sup> oxidiert und molekularer Sauerstoff (O<sub>2</sub>) zu Hyperoxid-Anionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) reduziert wird, welche zur Zerstörung der phagozytierten Pathogene führt.

Nach der Entdeckung von NOX2 wurden weitere homologe NOX in anderen Geweben entdeckt, so dass mittlerweile sieben verschiedene NOX bekannt sind (Tab. 1).

Name	Gewebe mit starker Expression	Gewebe mit mittlerer bis niedriger Expression
NOX1	Kolon	Glatte Muskulatur, Endothel, Uterus, Plazenta, Prostata, Osteoklasten, retinale Perizyten
NOX2	Phagozyten	B-Zellen, Neuronen, Kardiomyozyten, Skelettmuskulatur, Hepatozyten, Endothel, hämatopoetische Stammzellen, glatte Muskulatur
NOX3	Innenohr	Fötale Niere, fötale Milz, Schädelknochen, Gehirn
NOX4	Niere, Blutgefäße	Osteoklasten, Endothel, glatte Muskulatur, hämatopoetische Stammzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Melanomazellen, Neuronen
NOX5	Lymphgefäß, Hoden	Endothel, glatte Muskulatur, Pankreas, Plazenta, Eierstock, Uterus, Magen, verschiedene fötale Gewebe
DUOX1	Kehlkopf	Luftröhrenepithel, Zungenepithel, Kleinhirn, Hoden
DUOX2	Kehlkopf	Speichel- und Analdrüsen, gastrointestinale Epithelien, Luftröhrenepithel, Uterus, Gallenblase, Pankreasinseln

**Tab. 1 Arten und Vorkommen von NADPH-Oxidase**  
(angepasst aus [30])

### 2.5.2 p47phox und Autoimmunität

NOX2 spielt durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies eine Schlüsselrolle in der Verteidigung des Körpers gegen eindringende Pathogene. Allerdings kann eine exzessive Produktion eben dieser Sauerstoffspezies das umliegende Gewebe schädigen und zerstören. Da p47phox die organisierende Untereinheit der NOX2 ist, die somit die Kontrolle über die korrekte Funktion darstellt, hat die Abwesenheit oder Beschädigungen dieses Proteins schwerwiegende Konsequenzen für die angeborene Immunantwort.

Ein Beispiel für eine durch Mutationen in p47phox ausgelöste Krankheit ist die chronische Granulomatose (CGD). Es existieren fünf verschiedene Formen dieser Autoimmunkrankheit, wobei mit 75 % die Hauptgruppe der CGD-Patienten unter einer X-chromosomalen Mutation im Gen für gp91phox (*CybB*) leiden. Die weiteren Ursachen sind mit 18 % eine Mutation im Gen für p47phox (*Ncf1*), mit 4 % eine

Mutation im Gen für p67phox (*Ncf2*) und mit 3 % eine Mutation im Gen für p22phox (*Cyba*), sowie die sehr seltene autosomal dominante Form [31]. In allen Fällen führen die Mutationen zu einer dysfunktionalen NOX2 und damit zu lebensbedrohlichen Bakterien- und Pilzinfektionen, die schon im Kindesalter entstehen.

Neben CGD spielt p47phox auch in anderen Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis (RA) und dem Morbus Crohn (CD), eine große Rolle. RA führt zu starken Gelenkschmerzen und wird ausgelöst durch eine chronische Entzündung der Gelenke. Eine Erklärung für diese Krankheit ist das vermehrte Auftreten von Neutrophilen in der Gelenkflüssigkeit. Diese Neutrophilen weisen eine stärkere Phosphorylierung von p47phox und eine höhere Aktivität der NOX2 auf [32]. Dies kann zur Schädigung von Chondrozyten beitragen [33], was die Gelenkschmerzen erklären könnte. Eine weitere Theorie wurde im Rahmen der Identifikation eines Polymorphismus im *Ncf1* Gen von Ratten erstellt, welcher zu einer Veränderung der Enzymaktivität von p47phox führt. Dieser Polymorphismus an Position 153 des p47phox Proteins vermittelt bei Ratten eine Anfälligkeit für Arthritis, welche durch die Bildung von „arthritogenen“ CD4-positiven T-Zellen aufgrund der geringeren NOX2 Aktivität gekennzeichnet ist [34]. Diese Befunde konnten ebenfalls in Mäusen nachgewiesen werden, bei denen eine Mutation des *Ncf1* Gens zu stärkerer experimenteller Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) und Kollagen-induzierter Arthritis (CIA) zusammen mit einer gesteigerten autoimmun T-Zellreaktion führte [35]. Bei beiden Befunden äußert sich der Polymorphismus in *Ncf1* mit der Reduktion der ROS Produktion und einer erhöhten Anfälligkeit für RA. Dies widerspricht klar dem Dogma, dass eine hohe Anzahl von Radikalen Entzündungsreaktionen fördert [36] und deutet auf eine komplexere Rolle von ROS bei Entzündungsreaktionen, im speziellen bei RA, hin. ROS wurden nicht nur in Phagozyten, sondern auch in APCs gefunden [37]. Ebenso ist *Ncf1* Expression und Aktivität in APCs, jedoch nicht in T-Zellen zu beobachten [38,39]. Eine Modulation der T-Zellfunktion auf Grund der Oxidation der Zellmembran durch interagierende APCs ist möglich [40], [41], [42] und könnte die Interaktion von APC und T-Zellen beeinträchtigen. Dieses könnte die erhöhte Menge an arthritogenen CD4+ T-Zellen und die starke Arthritis erklären, welche durch die erniedrigte ROS-Produktion in den Experimenten von Olofsson und Hultqvist begünstigt wird. Eine ähnliche Situation wurde von Sakaguchi bei einem strukturellen Polymorphismus im *Zap70* Gen bei Mäusen beobachtet, der zu einer erhöhten T-

Zellautoreaktivität auf Gelenkantigene führte und sich in spontaner Arthritis äußerte [43].

### 2.5.3 p47phox und TLRs

Zusätzlich zu der Rolle als organisierende Untereinheit der NOX, wurde p47phox mit unterschiedlichen Komponenten aus den TLR-Signalwegen in Zusammenhang gebracht (Abb. 3). Es konnte gezeigt werden, dass die Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase 4 (IRAK4), eine zentrale Komponente vieler TLRs, p47phox phosphoryliert. Im Unterschied zu der Phosphorylierung, die der Aktivierung von p47phox als Komponente der NOX dient und durch Proteinkinase C (PKC) an Seringruppen stattfindet, phosphoryliert IRAK4 Threoningruppen von p47phox [2]. Es gibt Hinweise darauf, dass p47phox mit einem weiteren TLR-Signalmolekül, dem TNF-Rezeptor assoziierten Faktor 4 (TRAF4), einen Komplex eingehen kann, welcher die Aktivierung des Promoters für NF- $\kappa$ B und IFN- $\beta$  supprimiert [44]. Durch weitere Untersuchungen der Rolle von p47phox im TLR-Signalweg durch unsere Arbeitsgruppe wurde erstmals festgestellt, dass p47phox die IL-12p70 Produktion in murinen DCs nach Stimulation von TLR9 vermindert und diese Aktivität unabhängig von der Produktion von ROS stattfindet [1].

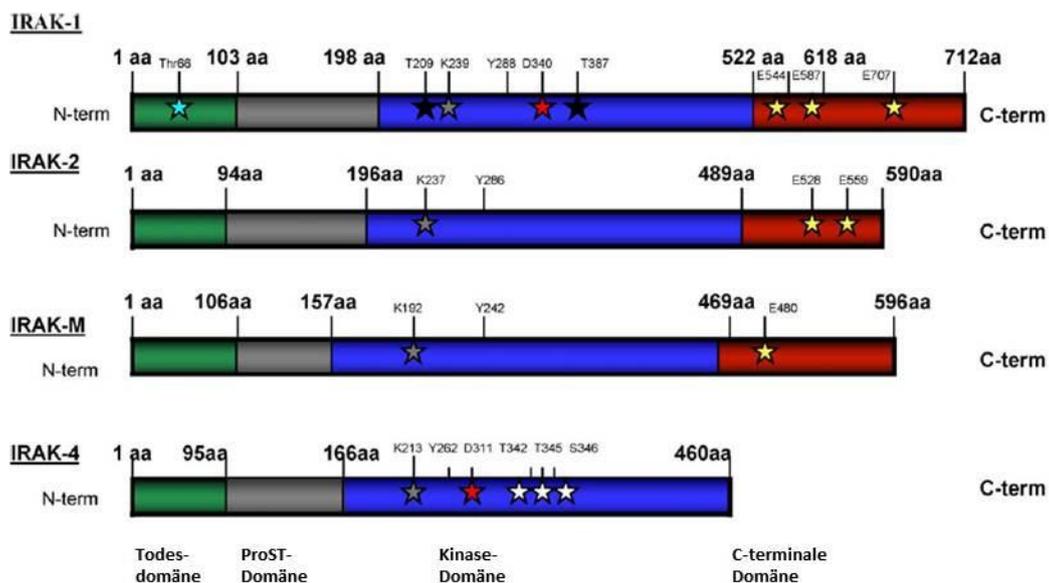
## 2.6 Rolle von IRAK4

Die IRAK4 ist das neueste Mitglied einer intrazellulären Kinasefamilie, zu der außerdem IRAK1, IRAK2 und IRAK3 (IRAKM) gehören. Diese Proteinfamilie spielt in den TLR-Signalwegen eine kritische Rolle für die Regulierung von Entzündung, Aktivierung der adaptiven Immunantwort und die Kontrolle von anti-inflammatorischen, sowie Autoimmunkrankheiten. Dabei agieren sie in den Signalwegen nach der Rekrutierung der Adapterproteine zum TLR und können zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B, MAPK, IRFs und möglichen anderen Signalkomponenten führen [45].

Ein Charakteristikum dieser Kinasefamilie, das sie von anderen Kinasen unterscheidet, ist eine Tyrosingruppe, welche den Eingang zur katalytischen Tasche kontrolliert (Gatekeeper) [46]. Als funktionelle Domänen besitzen die vier Proteine eine N-terminale Todesdomäne (death domain, DD), eine ProST-Domäne, die reich an Prolinen, Serinen und Threoninen ist, eine zentrale Kinase-Domäne und eine C-

terminale Domäne, welche nur bei IRAK4 fehlt (Abb. 5). Die DD ist essentiell für die Bindung an die Adaptormoleküle des TLR-Signalweges, und die ProST-Domäne scheint bei einigen IRAK-Proteinen nach einer Phosphorylierung zur Degradation zu führen. Die Kinase-Domäne ist essentiell für die Kinasefunktion der Proteine und enthält den oben erwähnten Tyrosin-Gatekeeper. In der C-terminalen Domäne befinden sich Bindungsmotive für eine Interaktion mit TRAF6, welche durch alle Proteine der Familie eingegangen werden können, außer durch IRAK4.

Es wurde gezeigt, dass die Abwesenheit von IRAK4 bei Mäusen zu einer kompletten Resistenz gegenüber LPS-induziertem Schock führt und die Zytokinproduktion nach Stimulation verschiedener TLRs stark vermindert ist [47]. Auf der anderen Seite gibt es Indikationen dafür, dass die Abwesenheit von IRAK4 zu einer Verlagerung des Signalweges von MyD88-gekoppelten TLRs zu anderen, unabhängigen Signalwegen führen kann [48]. Außerdem gibt es widersprüchliche Befunde zur katalytischen Aktivität von IRAK4 und deren Notwendigkeit für die Signalweiterleitung [49–51], welches zusammen mit den anderen Ergebnissen in einem noch unvollständigen Bild der Funktion von IRAK4 im TLR-Signalweg resultiert.



**Abb. 5 Funktionelle Domänen der humanen IRAK-Proteine**  
(angepasst aus [37])

## 2.7 Zielsetzung der Doktorarbeit

Wie in den vorangehenden Abschnitten beschrieben ist p47phox ein in mehreren Strukturen involviertes Protein, welches in seiner Funktion einen großen Einfluss auf das Immunsystem nehmen kann und damit auch zu schweren Erkrankungen wie der CGD aber auch Autoimmunkrankheiten führen kann. Wegen der Vielfalt der Interaktionen ist es schwierig, die Effekte von p47phox einer bestimmten Interaktion zuzuordnen. Dennoch ist es unserer Arbeitsgruppe gelungen, eine negative Rückkopplung von p47phox auf die Produktion von IL-12p70 [1] festzustellen. Ausgehend von dieser Interaktion und der Phosphorylierung von p47phox durch IRAK4 [2], soll in dieser Doktorarbeit der Zusammenhang einer Modulation der IL-12p70-Produktion durch IRAK4 näher untersucht werden. Außerdem soll die Art der Interaktion von p47phox und IRAK4 mit den TLR-Signalwegen zur Produktion von IL-12p70 näher charakterisiert werden.

Angelehnt an dieses Themengebiet gliedert sich die vorliegende Doktorarbeit in vier Teilabschnitte:

### **Untersuchungen zur Modulation von IL-12p70 durch IRAK4**

Für diese Untersuchungen sollen primäre DCs aus dem Knochenmark von Wildtyp, IRAK4<sup>-/-</sup> und p47phox<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert und mit verschiedenen Stimuli der TLR-Signalwege zur Produktion von Zytokinen angeregt werden. Die anschließende Messung der Zytokine im Zellkulturüberstand und die Isolation der Proteine sowie der RNA aus den Zellen soll Aufschluss über die möglichen Interaktionen von Komponenten der Signalwege, sowohl auf Protein als auch auf genomischer Ebene, geben.

### **Charakterisierung von DCs, welche für die p47phox- bzw. IRAK4-abhängige Modulation von IL-12p70 verantwortlich sind**

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Hemmung der Produktion von IL-12p70 hauptsächlich in einer Subpopulation der DCs, den CD11c positiven Zellen, stattfindet. Da es sich nach Isolation der primären Knochenmarkszellen um ein Gemisch verschiedener Subpopulationen handelt, welche zur Untersuchung der Modulation der IL-12-Produktion herangezogen werden, ist es essentiell, die Effektorzellen für diesen

Mechanismus zu charakterisieren. Hierzu wird der Versuchsaufbau aus dem zuvor beschriebenen Teilabschnitt verwendet. Es erfolgt eine Markierung bestimmter Oberflächenmarker der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, sowie eine anschließende durchflusszytometrische Auswertung zur Charakterisierung der Subpopulation.

### **Etablierung von Methoden zum Einbringen von shRNA und siRNA in DCs zur Modulation der p47phox- und IRAK4-Expression**

Für die in den vorherigen Abschnitten erläuterten Versuche werden DCs aus primären Knochenmarkzellen isoliert, differenziert und anschließend für die Versuchsdurchführung verwendet. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine systemweite Zerstörung des Zielgens in den genetisch veränderten Mäusen negative Auswirkungen auf mehrere Zielstrukturen innerhalb der Mäuse haben kann und somit die Produktion von IL-12 nur indirekt betroffen ist. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit durch das Einbringen von „short hairpin“ RNA (shRNA) bzw. „small interfering RNA“ (siRNA) in DCs aus Wildtyp-Mäusen eine direkte Regulierung der Zielgene *IRAK4* und *Ncf1* stattfinden, um dadurch eventuelle systemische Beeinflussungen auszuschließen.

### **Untersuchung der molekularen Angriffsorte von p47phox und IRAK4 innerhalb der TLR-Signalkaskade und weiterer Interaktionspartner**

Bisher ist nur unzureichend belegt worden, in welcher Weise p47phox in die Signalkaskade der TLR-Signalwege zur Produktion von IL-12p70 eingreift. Neben IRAK4, einem direkt in der Signalkaskade vorhandenen Protein, soll auch TRAF4 ein direkter Interaktionspartner von p47phox sein. Weitere Kandidaten wären „NF- $\kappa$ B essential modulator“ (NEMO) und TRAF6, aber auch Untereinheiten von NF- $\kappa$ B könnten eine Rolle spielen. Dieser Frage soll mit Hilfe von Immunoblots, Ko-Immunopräzipitationen und Thermophoreseversuchen mit primären murinen Knochenmarkzellen von Wildtyp- und Knock-out Mäusen, sowie durch siRNA bzw. shRNA veränderte DCs nachgegangen werden.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Mauslinien

##### 3.1.1 Wildtyplinie C57BL/6

Als Kontrollmäuse wurde die Mauslinie C57BL/6 verwendet, eine Sublinie der Inzuchtlinie C57BL, die 1921 von C.C. Little entdeckt wurde. Da sie relativ einfach zu züchten, sehr robust und die Individuen durch lange Inzucht genetisch nahezu identisch sind, wird sie häufig als genetischer Hintergrund für genetisch veränderte Mäuse verwendet. Es ist außerdem bekannt, dass die Immunantwort von C57BL/6 Mäusen zu Gunsten einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort ausfällt und C57BL/6 Mäuse unter anderem resistent gegen *Leishmania major* sind [52]. Die verwendeten Mäuse wurden bei der Firma Janvier (Saint Berthevin Cedex, Frankreich) gekauft und bis zum Versuchsbeginn in der lokalen zentralen Forschungseinrichtung gehalten.

##### 3.1.2 p47phox<sup>-/-</sup> Mäuse

Chronische Granulomatose (CGD) ist eine seltene Erkrankung bei der die Phagozyten der betroffenen Patienten nicht in der Lage sind, reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren, welche für die Abwehr von Pathogenen erforderlich sind. Das erste Mausmodell für CGD mit einem mutierten p47phox wurde durch die Insertion einer Neomycinkassette im Exon 7 des *Ncf1*-Gens hergestellt [53] und zur Verwendung in dieser Arbeit von Prof. Ralf Brandes (Uniklinik Frankfurt, Deutschland) und Dr. Cornelia Richter (Uniklinik Dresden, Deutschland) bereitgestellt. Bis zur Durchführung der Versuche wurden die Mäuse in der zentralen Forschungseinrichtung unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten.

##### 3.1.3 IRAK4<sup>-/-</sup> Mäuse

Ein IRAK4-Defekt wurde erstmals 2003 in drei unabhängigen Patienten beschrieben [54]. Patienten mit dieser seltenen, autosomal rezessiven Immunerkrankung leiden unter wiederkehrenden Infektionen durch pyogene Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* aufgrund der zentralen Rolle von IRAK4 in den TLR-Signalwegen. Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell für die IRAK4-Defizienz wurde durch das Einsetzen einer Neomycinkassette in das Startcodon und Exon 2 des IRAK4-Gens entwickelt [47] und die Mäuse wurden von T.W. Mak (Amgen Institute, Toronto, Kanada) zur Verfügung gestellt. Die Mäuse wurden bis zur

Versuchsdurchführung in der zentralen Forschungseinrichtung unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten.

### **3.1.4 TRIF<sup>-/-</sup> Mäuse**

Bei den TRIF-defizienten Mäusen handelt es sich um Mäuse der Linie C57BL/6, bei denen eine Basenpaardeletion im Bereich des Chromosoms 17 eingefügt wurde. Diese Deletion wurde zufällig mit dem alkylierenden Reagenz N-Nitroso-N-ethylurea (ENU) herbeigeführt und resultiert in einer Rasterschubmutation (frame shift mutation), welche zu einem verkürzten Protein führt. Aufgrund dieser Mutation kommt es zu einem Defekt im TRIF-basierten TLR-Signalweg. Die Mäuse wurden von B. Beutler (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas Texas, USA) wie beschrieben [55] hergestellt und von Z. Waibler (Paul-Ehrlich-Institut, Langen) zur Verfügung gestellt.

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Isolierung und Differenzierung muriner primärer Zellen aus dem Knochenmark

Zur Isolierung muriner primärer Zellen aus dem Knochenmark wurden die Mäuse nach der Betäubung mit Isofluran mittels zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurden die Mäuse auf einem Operationstisch fixiert, vom Bauch zu den Hinterbeinen hin gehäutet und die Hinterbeine in Höhe der Hüfte abgetrennt. Das Fleisch von Femur und Tibia wurde entfernt und die Knochen durch Überstrecken voneinander separiert. Die Enden von Femur und Tibia wurden mit einer Schere abgeschnitten und das Knochenmark mit einer 26G Kanüle und 10 ml Spritze gefüllt mit PBS in ein Falcontube ausgespült. Anschließend wurden die Zellen bei 230 g<sub>n</sub> (230fache mittlere Erdbeschleunigung) für 6 Min. zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt erfolgte die Lyse der Erythrozyten mit 1,5 ml ACK-Puffer pro Bein (1 Min. bei Raumtemperatur (RT)). Anschließend wurde die Reaktion mit serumhaltigem Medium abgestoppt, die Zellsuspension erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden dann in KM-Medium mit 10% FCS (Fetales Kälberserum) aufgenommen und mittels einer Neubauer Zählkammer gezählt. Nach Zugabe von 100 ng/ml GM-CSF wurden 0,5 x 10<sup>6</sup>Zellen/ml in 25 ml bis 35 ml Medium in T175-Zellkulturflaschen überführt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank für eine Woche ausdifferenziert.

<b>KM-Medium:</b>	RPMI 1640 Glutamax mit
	100 IU/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	10 mM HEPES
	1 mM Natrium Pyruvat
	50 µM β-Mercaptoethanol
<b>ACK-Puffer:</b>	0,15 M NH <sub>4</sub> Cl
	10 mM KHCO <sub>3</sub>
	0,1 mM Na <sub>2</sub> EDTA

### 3.2.2 Kultivierung und Stimulation muriner primärer Zellen aus dem Knochenmark

Am vierten Tag nach der Isolation der primären Zellen aus dem Knochenmark wurden 2/3 des Mediums aus der Zellkulturflasche entnommen und die Suspensionszellen bei 230 g<sub>n</sub> für 6 Min. abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit dem gleichen Volumen serumhaltigem KM-Medium gelöst und in die Zellkulturflasche zurückgeführt. Anschließend wurden erneut 100 ng GM-CSF pro ml Gesamtzellkulturmedium zugesetzt und die Zellen für weitere drei Tage inkubiert.

Nach einer einwöchigen Inkubation der aus dem Knochenmark gewonnenen primären Zellen wurden die adhärenen Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und zusammen mit den Suspensionszellen aus der Zellkulturflasche entnommen. Im Anschluss wurde diese Zellsuspension bei 230 g<sub>n</sub> für 6 Min. zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in serumfreiem KM-Medium aufgenommen und die Zellen mittels Automatic Cell Counter (Bio-Rad) gezählt. Die Stimulation erfolgte in 6- oder 12-Lochplatten mit  $2 \times 10^6$  Zellen bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen pro Probe. Im Anschluss wurden die Zellen für 1 h in serumfreiem KM-Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert bevor sie den in Tabelle 2 aufgeführten Stimuli ausgesetzt wurden. Um die Effekte der jeweiligen Stimulantien auf die Zellen zu beobachten wurden je nach Versuchsaufbau nach 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 36, 48 und 72 h Proben entnommen.

Stimulus	Hersteller	Konzentration
LPS (E. coli)	Sigma Aldrich (#L3129)	1 µg/ml
LPS R515 (E. coli)	Alexis Biochemicals (#ALX-581-007)	1 µg/ml
CpG ODN 2216	Invivo Gen (#tlrl-2216-1)	2,5 µM
PolyI:C	Invivo Gen (#tlrl-pic)	25 µg/ml
Flagellin	Invivo Gen (#tlrl-stfla)	1 µg/ml
IRAK1/4-Inhibitor	Calbiochem (#407601)	30 µM
PMA	Sigma Aldrich (#P8139-1MG)	200 nM

**Tab. 2 Substanzen zur Stimulation primärer muriner Knochenmarkszellen**

### 3.2.3 Elektroporation muriner primärer Zellen aus dem Knochenmark

Um Fremd-DNA oder RNA in murine primäre Zellen einzubringen, wurde die Methode der Elektroporation mittels eines Gene Pulser X cell von Bio-Rad gewählt. Die Zellen wurden je nach Versuchsaufbau nach 4 oder 7 Tagen Ausdifferenzierung (3.2.2) geerntet, bei 230 g<sub>n</sub> abzentrifugiert, der Zellüberstand verworfen und das Pellet in 10 ml

PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mittels eines Automatic Cell Counters gezählt und in einer Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l Opti-MEM Medium aufgenommen. Je nach Versuchsaufbau wurden die in Tabelle 3 aufgeführten siRNAs verwendet. Dabei wurden 10  $\mu$ g der entsprechenden siRNA auf den Boden einer 4 mm Küvette pipettiert, die 100  $\mu$ l Zellsuspension zugegeben und für 3 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Küvette in den Gene Pulser X cell überführt und die Zellen zweimal mit 1000 V für 0,5 ms mit Square Waves elektroporiert. Direkt nach der Elektroporation wurde 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes KM-Medium mit 10% FCS in die Küvette gegeben. Im Anschluss wurden Proben, die mit der gleichen siRNA elektroporiert worden waren, in einem Falcontube zusammengeführt und mit 4 ml serumhaltigem KM-Medium pro Probe aufgefüllt. Für die an Tag 4 der Ausdifferenzierung elektroporierten Zellen wurde zusätzlich 100 ng/ml GM-CSF zugefügt. Anschließend wurden die Zellen weitere drei Tage in Zellkulturflaschen ausdifferenziert, so dass sich eine Gesamtkultivierungsdauer der Primärzellen von 7 bzw. 10 Tagen ergab. Nach vollendeter Kultivierung wurden die Zellen stimuliert (3.2.2).

Name	Sequenz 5' – 3'	Quelle	Hersteller
NM_010876si 1	UAACGUAGCUGACAUCACA	MWG	
TRC70651	GAACCGUAUGUAACCAUCAA A	siRNA wizard v3.1 - Invivogen	Eurofins MWG Operon
TRC70651scr	GAAUGCCCAAACACGUAUAA U	siRNA wizard v3.1 - Invivogen	
IRAK4 V2MM_71779	CCCUCAACUACUGCUGGAUUAU U(dTdT)	Open Biosystems	
IRAK4wizard	GAAGAGAAGACGAUUGAAGA U(dTdT)	siRNA wizard v3.1 - Invivogen	Eurofins MWG Operon
IRAK4 wizardscr	GAAGGUAGUACGAAAGAUGA A(dTdT)	siRNA wizard v3.1 - Invivogen	

**Tab. 3 siRNA zur Elektroporation primärer muriner Knochenmarkszellen**

### **3.2.4 Transfektion primärer muriner Knochenmarkszellen mittels einer Kombination aus Elektroporation und Lipofektion**

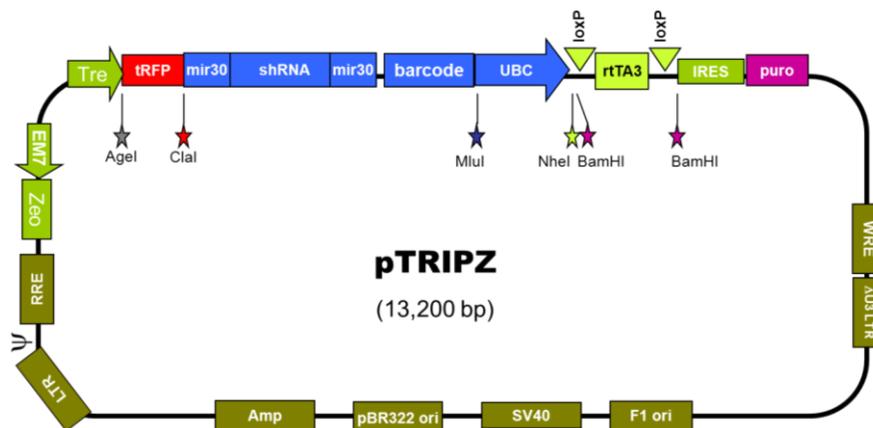
Eine Alternative für die Transfektion stellt die Kombination aus Lipofektion und Elektroporation mit dem Nucleofector der Firma Amaxa dar. Hierzu wurden primäre murine Knochenmarkszellen an Tag 5 der Ausdifferenzierung geerntet, auf  $2,5 \times 10^6$  Zellen pro Probe eingestellt und 6 Min. bei RT und 230  $g_n$  zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in 100  $\mu$ l Nucleofector Solution resuspendiert, 2  $\mu$ g pcDH1-cop-GFP bzw. Kontrollvektor pmaxGFP der Firma Amaxa hinzugegeben und die Lösung in Spezialküvetten überführt. Es erfolgte die Behandlung der Zellen nach Angaben des Herstellers im Nucleofector mit dem Programm Y-001 bzw. AN-001. Nach der Entnahme der Küvetten aus dem Gerät wurden pro Probe 400  $\mu$ l KM-Medium mit 10 % FCS zu den Zellen in den Küvetten hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen mit einer Spezialpipette entnommen und zur weiteren Kultivierung in 24-Loch-Zellkulturplatten überführt. Es erfolgte die Kontrolle der Fluoreszenz unter dem Mikroskop an den folgenden zwei Tagen. Die Auswertung erfolgte am dritten Tag nach der Transfektion mittels Durchflusszytometrie.

### **3.2.5 Transfektion von HEK293T Zellen mit Plasmiden zur Produktion lentiviraler Partikel**

Eine weitere Methode um Fremd-DNA in Zellen zur konstitutiven Expression einzubringen, stellen lentivirale Vektoren (LV) dar. Lentiviren sind eine Gattung innerhalb der Retroviren, mit deren Hilfe man genetische Informationen stabil in das Wirtsgenom von aktiven, sowie ruhenden Zielzellen einfügen kann. Bei den Sequenzen der zu transfizierenden Plasmide handelt es sich um Abwandlungen vom humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1), wobei das HIV-1-Genom so modifiziert wurde, dass es nicht mehr zur Produktion infektiöser Partikel fähig ist. Zu diesem Zweck wurden die zur Verpackung, sowie Herstellung der Hüllproteine nötigen Sequenzen und die zu transferierende Zielsequenz auf drei verschiedene Plasmide aufgeteilt. Die drei Plasmide werden in eine Produktionszelllinie humaner embryonaler Nierenzellen (HEK293T) co-transfiziert, welche daraufhin die nicht replikationskompetenten LV produziert.

### 3.2.5.1 Transfektion mittels Open Biosystems

Für diese Transfektionsmethode wurden die von der Firma Open Biosystems erhältlichen induzierbaren lentiviralen Vektoren pTRIPZ (Tab. 4, Abb. 6), das Transfektionsreagenz Arrest-In und das TransLenti Viral shRNA Packaging System nach Angaben des Herstellers verwendet. Danach werden zu 90 % konfluente HEK293T Zellen an Tag 1 transfiziert und der Überstand nach 48 h und 72 h geerntet. Der Überstand wird durch Ultrazentrifugation bei 23.000 rpm für 1,5 h bei 4 °C einkonzentriert. Das Pellet wird im Anschluss in 250 µl Medium aufgenommen, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.



**Abb. 6 Induzierbarer lentiviraler Vektor zur Transfektion von DCs**  
Lentiviraler Vektor der Firma Open Biosystems zur Integration einer beliebigen shRNA unter Kontrolle eines durch Tetracyclin induzierbaren Promoters (Tre/rtTA3) und des Fluoreszenzmarkers turboRFP (tRFP) unter Kontrolle eines konstitutiv exprimierten Promoters.

Vektorname	shRNA Sequenz 5' – 3' prozessierter Antisense-Strang
pTRIPZ-Ncf1 124572	TGACACTAGTCATTAGTTG
pTRIPZ-Ncf1 346254	TTTTTGTCTGGTTGTCCGT
pTRIPZ-GAPDH	Positiv Kontrolle; Bindung an murine GAPDH-mRNA
pTRIPZ-NS	Negativ Kontrolle; kein Abbau von mRNA

**Tab. 4 Varianten des lentiviralen Vektors pTRIPZ**

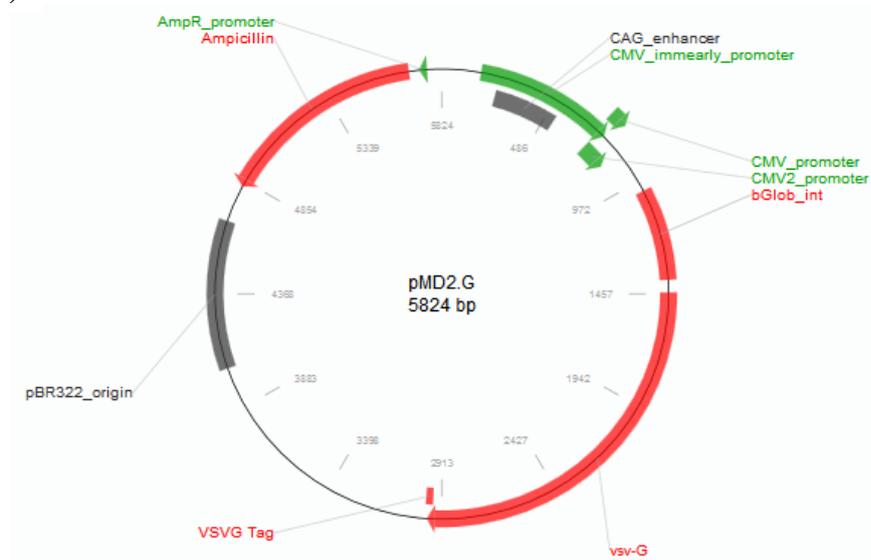
### 3.2.5.2 Transfektion mittels Polyethylenimin

Bei dieser Transfektionsmethode werden zu 70 – 80 % konfluente HEK293T Zellen mit  $5,5 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm Zellkulturschalen in 6 ml TF/PEI-Medium mit 10 % FCS ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurde für jede zu transfizierende Probe ein Transfektionsmix A aus 36 µg des Verpackungsvektors psPAX2, 4 µg pMD2.G und 42 µg LV pTRIPZ in einem Gesamtvolumen von 525 µl TF/PEI-Medium, sowie ein Transfektionsmix B, bestehend aus 34 µl Polyethylenimin (PEI) (1 mg/ml) und 491 µl TF/PEI-Medium, hergestellt. Mix A und B wurden kombiniert und 20 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde der hierdurch entstandene Mix mit TF/PEI-Medium auf 5 ml aufgefüllt und zu den Zellen in einer Zellkulturschale gegeben. Die Zellen wurden hiernach 6 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, bevor das Transfektionsmedium durch 6 ml TF/PEI-Medium mit 10 % FCS ersetzt und die Zellen für weitere 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert wurden. Zum Abschluss wurde der die LV enthaltende Zellkulturüberstand abgenommen, steril filtriert (0,45 µm Filter) und direkt für die Transduktion weiterverwendet.

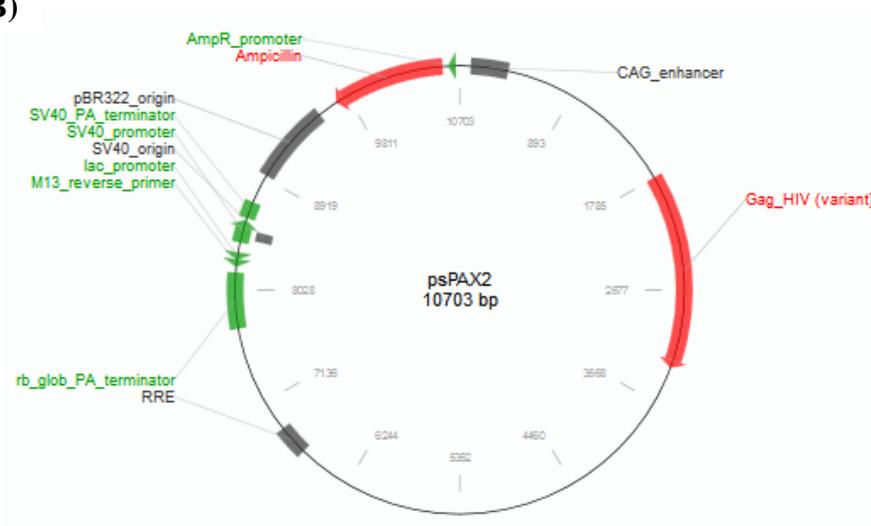
**TF/PEI-Medium:**

DMEM Glutamax mit  
100 IU/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin

A)



B)



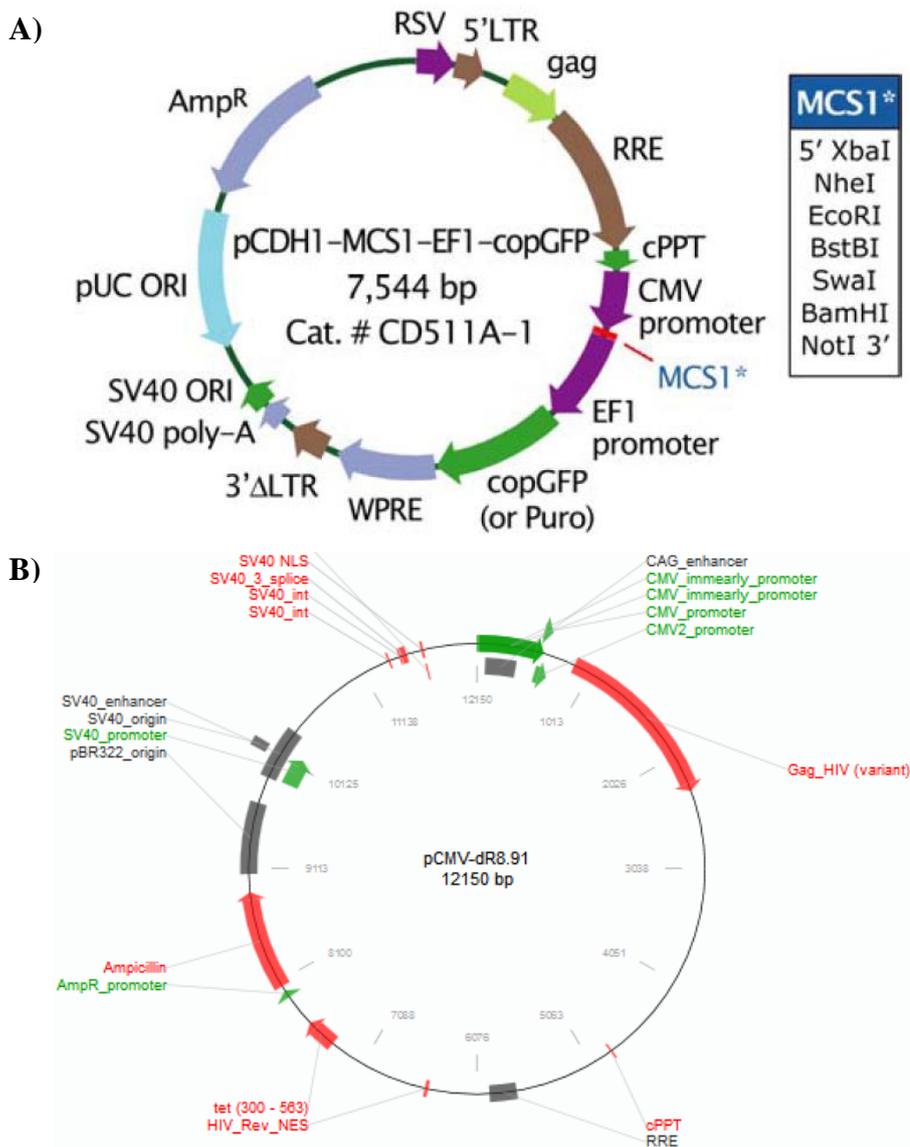
**Abb. 7 Plasmide zur Herstellung von lentiviralen Vektoren 1**

A) pMD2.G zur Expression des Hüllproteins, b) psPAX2 zur Expression der Verpackungsgene

### 3.2.5.3 Transfektion mittels HBS-Puffer

Zur Transfektion der Plasmide werden am ersten Tag konfluent gewachsene HEK293T Zellen je Ansatz mit  $0,75 \times 10^6$  Zellen in 9 ml TF-Medium in  $10 \text{ cm}^2$  Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $5 \%$   $\text{CO}_2$  kultiviert. Am nächsten Tag wird das Medium 2-3 h vor der Transfektion gewechselt und die Zellen weiterhin bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $5 \%$   $\text{CO}_2$  kultiviert. Für jede zu transfizierende Zielsequenz werden  $500 \text{ } \mu\text{l}$  1 x HBS in ein Reaktionsgefäß pipettiert, anschließend werden  $13,2 \text{ } \mu\text{g}$  Plasmid mit Zielsequenz,  $10 \text{ } \mu\text{g}$  pCMV-delta8.91 (Abb. 8) und  $4 \text{ } \mu\text{g}$  pMD2.G zugefügt und durch vorsichtiges Resuspendieren gemischt. Danach erfolgt die Zugabe von  $30 \text{ } \mu\text{l}$   $2,5 \text{ M}$   $\text{CaCl}_2$ . Der Transfektionsmix wird für 20 Min. bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise zu den Zellen gegeben, wobei die Zellkulturschale leicht hin und her gekippt wird. Nach 16 h Inkubation der Zellen mit den Plasmiden bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $5 \%$   $\text{CO}_2$ , wird das alte Medium abgenommen und 5 ml frisches TF-Medium zugegeben. Nach weiteren 24 h erfolgt die Abnahme des gesamten Überstandes von 5 ml mit anschließender Lagerung in einem 15 ml Falcon-Tube bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Es werden erneut 5 ml frisches TF-Medium zugegeben, die Fluoreszenz der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert und für weitere 24 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $5 \%$   $\text{CO}_2$  inkubiert. Der 48 h-Überstand wird am nächsten Tag zu dem 24 h-Überstand gegeben, gemischt und anschließend aliquotiert bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren. Zur Bestimmung des Gehaltes an Virus-RNA im Überstand wird eine Lenti-X qRT-PCR durchgeführt (3.3.6).

<b>TF-Medium:</b>	DMEM Glutamax mit	
	100 IU/ml	Penicillin
	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Streptomycin
	10 %	FCS
<b><math>\text{Na}_2\text{HPO}_4(7\text{H}_2\text{O})</math></b>	0,94 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4(7\text{H}_2\text{O})$
	ad 50 ml	$\text{H}_2\text{O}$
<b>1xHBS:</b>	2,5 g	HEPES
	4,0 g	NaCl
	0,55 g	Glukose Monohydrat
	1,85 g	KCl
	5 ml	$\text{Na}_2\text{HPO}_4(7\text{H}_2\text{O})$
	ad 500 ml	$\text{H}_2\text{O}$



**Abb. 8 Plasmide zur Herstellung von lentiviralen Vektoren 2**

A) pCMV-delta8.91 zur Expression der Verpackungsgene; B) Leervektor pCDH1-cop-GFP mit Fluoreszenzmarker zur Integration der Zielsequenz

### 3.2.6 Transduktion von primären murinen Zellen mit lentiviralen Partikeln

Die in 3.2.4 hergestellten LV wurden mit dem Zellüberstand geerntet und der Gehalt per PCR festgestellt. Die primären murinen Zellen werden wie in 3.2.1 beschrieben isoliert und kultiviert, jedoch nicht am vierten Tag mit neuem Medium versorgt. Die Zellen werden am fünften Tag geerntet und mit  $0,75 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz in 1 ml TD-Medium in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wird ein Transduktionsmix aus  $3,5 \times 10^9$  Virus-RNA-Kopien und 4 µg 2,5 M Protaminsulfat in 1 ml TD-Medium zu den Zellen gegeben. Die Zellen werden bei

340 g<sub>n</sub> für 10 Min. bei 37 °C zentrifugiert und anschließend für 5 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Danach wird 1 ml TD-Medium ausgetauscht und die Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt eine erneute Transduktion, wobei nach 5 h Inkubation der LV das gesamte Medium gegen frisches TD-Medium ausgetauscht wird. An den folgenden zwei Tagen wird die Transduktion durch das Überprüfen der Fluoreszenz am Mikroskop kontrolliert, wobei am zweiten Tag im Anschluss eine Stimulation der Zellen erfolgen kann. Am achten Tag nach der Isolation der Zellen werden diese geerntet und je nach Versuchsaufbau Proben entnommen. Ein Teil der Zellen wird zur Kontrolle der Transduktion mittels Durchflusszytometrie auf ihre Fluoreszenz hin ausgewertet.

<b>TD-Medium:</b>	RPMI 1640 Glutamax mit
	100 IU/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	10 mM HEPES
	1 mM Natrium Pyruvat
	50 µM β-Mercaptoethanol
	40ng/ml GM-CSF

### 3.2.7 Proteinisolation aus dem Gesamtzelllysat muriner primärer Knochenmarkszellen

Um Zytoplasma- und Membranproteine zu isolieren, wurden die zuvor aus den Mäuseknochen isolierten und mit  $2 \times 10^6$  Zellen pro Probe stimulierten Zellen bei RT mit 230 g<sub>n</sub> für 6 Min. zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit eiskaltem PBS gewaschen und erneut bei 230 g<sub>n</sub> zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 100 µl frisch zubereitetem Proteinisolationspuffer resuspendiert und die entstandene Zellsuspension 10 Min. auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 6,7 µl 10 % NP-40 zugegeben, die Probe resuspendiert und 10 Min. bei 4 °C und 13000 g<sub>n</sub> zentrifugiert. Der die Membran- und Zytoplasmaproteine enthaltende Überstand wurde dann abgenommen und bei -80 °C gelagert.

<b>Proteinisolationspuffer:</b>	10 mM	HEPES-KOH pH 8,0
	10 mM	KCl
	0,1 mM	EDTA
	0,1 mM	EGTA
	25x	Proteinaseinhibitorcocktail
	0,5 mM	NaF
	1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>

### 3.2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Konzentration von isoliertem Gesamtprotein aus murinen primären Zellen zu bestimmen, wurde das Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Reagent von Pierce/ThermoScientific laut Herstellerangaben verwendet. Hierbei findet eine Biuret-Reaktion statt, welche zur Bildung eines blauen Komplexes führt, der durch das Zugabe von BCA in einen violetten Komplex umgewandelt wird. Dieser violette Komplex weist mit Zunahme der Gesamtproteinkonzentration eine starke lineare Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm auf. Im Vergleich zu einer Albumin-Standardkurve kann so die Proteinkonzentration des Gesamtzelllysats der Proben bestimmt werden. Zur Messung wurden die Proben 1:5 mit Aqua dest. verdünnt, im Doppelwert aufgetragen und nach 30 Min. Inkubation bei 37 °C im Photometer SpectraMax M5<sup>e</sup> (Molecular Devices) gemessen.

### 3.2.9 Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehören freie Radikale wie das Hydroxyl-Radikal und Hyperoxid-Anion, stabile molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxid und angeregte Sauerstoffmoleküle wie Singulett-Sauerstoff. Mit der redoxsensitiven Substanz Dihydroethidium (DHE) ist es möglich, das in den Zellen entstehende Hyperoxid-Anion zu messen. DHE ist membrangängig und wird innerhalb der Zelle durch Hyperoxid-Anionen zu Ethidium oxidiert. Ethidium bindet an die DNA im Zellkern und emittiert nach Anregung bei 488 nm eine rote Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 650 nm.

Für die Messungen wurden murine primäre Knochenmarkszellen nach Ende der Stimulation in der 24-Lochplatte bei 230 g<sub>n</sub> für 6 Min. abzentrifugiert, mit serumfreiem KM-Medium gewaschen und erneut zentrifugiert. Es wurden 500 µl 5 µM DHE in serumfreiem KM-Medium zu jeder Probe gegeben und für 30 Min. bei 37 °C und 5 %

CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und in 500 µl serumfreiem KM-Medium aufgenommen. Die Fluoreszenz des umgesetzten DHE wurde sofort im Photometer SpectraMax M5<sup>e</sup> (Molecular Devices) bei 480/650 nm mit neun Datenpunkten pro Probe gemessen. Als Kontrollen wurden unstimulierte Zellen ohne DHE-Zugabe verwendet.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 DNA-Isolierung aus primären Knochenmarkszellen

Für die DNA-Isolierung wurden  $1-2 \times 10^6$  Zellen pro Probe pelletiert und anschließend mit dem peqGold Blood DNA Mini Kit (peqLab) nach Angaben des Herstellers weiterverarbeitet. Die Konzentration der mit 50  $\mu$ l Elution Buffer eluierten DNA wurde photometrisch im Nano-Drop 1000 (ThermoScientific) ermittelt.

#### 3.3.2 RNA Isolierung

Es wurden  $1-2 \times 10^6$  Zellen pro Probe pelletiert und die RNA mit dem peqGold Total RNA Kit (peqLab) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration der mit 30  $\mu$ l RNase-freiem Wasser eluierten RNA wurde anschließend photometrisch im Nano-Drop 1000 ermittelt.

#### 3.3.3 cDNA Herstellung

Zur Ermittlung der Expression unterschiedlicher, spezifischer mRNAs in der isolierten gesamt-mRNA, wurden jeweils gleiche Mengen mRNA mittels reverser Transkriptase PCR (RT-PCR) in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt. Hierzu wurde das High-Capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers und unter Verwendung des RT-Programms im Thermocycler (Biometra) angewendet.

<b>RT Programm</b>	<b>Temp. (°C)</b>	<b>Zeit (Min.)</b>
Schritt 1	25	10
Schritt 2	37	120
Schritt 3	85	5

**Tab. 5 RT-PCR Programm zur Herstellung von cDNA**

### 3.3.4 Qualitative PCR

Zur Genotypisierung der Mauslinien wurde eine qualitative PCR mit den in Tabelle 6 aufgeführten Primern verwendet. Hierzu wurde ein Mastermix hergestellt, mit 1 µg genomischer DNA gemischt und mit dem entsprechenden Programm im Thermocycler amplifiziert. Die Amplifikate wurden je nach Größe des Amplikons auf 1-3 % Agarosegele aufgetragen und bei 100 V in 1x TAE-Puffer in einer Sub Cell GT Gelkammer (Bio-Rad) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele in der GELDOC Kammer (Bio-Rad) unter UV-Licht ausgewertet und fotografiert.

Primer	Sequenz 5' – 3'	Basenpaare	Bemerkung
GT mp47phox256	ACATCACAGGCCCCATCATCCT CC	650	zus. mit 256 für WT
GT mp47phox257	GGAGAGCCCCCTTTCTCTCCCTC A		
GT mp47phox258	CAACGTCGAGCACAGCTGCGCA AG	900	zus. mit 256 für KO
GT mIRAK4 FW	GAACACGCTCCCAGGTCTCTTT CCAACA	488	zus. mit FW für WT
GT mIRAK4 WT	TCTTCTACCTGAAATATGAAAG ATTCTT		
GT mIRAK4 KO	TGAATGGAAGGATTGGAGCTAC GGGGT	600	zus. mit FW für KO

Tab. 6 Genotypisierungsprimer

PCR Mastermix	Konz.	Volumen
PCR-Puffer	10 x	5,0 µl
dNTP	10 mmol	1,0 µl
Primer 1	10 pmol/µl	1,0 µl
Primer 2	10 pmol/µl	1,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 µl
DNA	1 µg/µl	1,0 µl
Taq-Polymerase	5 u/µl	0,2 µl
Aqua dest.		ad 50 µl

Tab. 7 Mastermixe für die qualitative PCR

<b>p47phox Programm</b>	<b>Temp. (°C)</b>	<b>Zeit (Min.)</b>	<b>Zyklen</b>
Denaturierung	95	15	
Denaturierung	95	1	32
Annealing	58	1	
Elongation	72	1	
Fin. Elongation	72	10	
<b>IRAK4 Programm</b>	<b>Temp. (°C)</b>	<b>Zeit (Min.)</b>	<b>Zyklen</b>
Denaturierung	95	15	
Denaturierung	95	1	40
Annealing	60	1	
Elongation	72	1	
Fin. Elongation	72	10	

**Tab. 8 Thermocycler-Programm für Genotypisierungen**

<b>50xTAE-Puffer:</b>	57,1 ml	Eisessig
	242 g	TRIS
	37,2 g	Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O
	ad 1 l	Aqua dest.

### 3.3.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Primer und Carboxyfluorescein (FAM)/Tetramethylrhodamin (TAMRA) markierte Sonden wurden in einem vorgefertigten 20x TaqMan Gene Expression Assay der Firma Applied Biosystems für die Gene IL-12p35, IL-12p40, IRAK1-4, Zbtb46 und das Kontrollgen GAPDH bzw. Csnk2a2 verwendet. Jede Probe wurde als Duplikat mit TaqMan FAST Advanced Master Mix (Applied Biosystems) in einem Reaktionsansatz von 10 µl in einem 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) gemessen. Für jedes Gen einer Probe wurde mittels des Kontrollgens eine normalisierte Ratio gebildet und die Änderung der mRNA-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

<b>qRT-PCR Reaktionsansatz</b>	<b>Konz.</b>	<b>Volumen</b>
TaqMan FAST Advanced Master Mix	2x	5,0 µl
TaqMan Gene Expression Assay	20x	0,5 µl
cDNA	100-500 ng	1,0 µl
Aqua dest.		ad 10 µl

**Tab. 9 Mastermixe für die qRT-PCR**

qRT-PCR Programm	Temp. (°C)	Zeit (Sek.)	Zyklen
Schritt 1	95	20	
Schritt 2	95	3	40
Schritt 3	60	30	

**Tab. 10** Thermocycler-Programm für qRT-PCR

### 3.3.6 qRT-PCR zur Bestimmung von Lentivirus-RNA-Gehalt

Für die Bestimmung des Gehaltes an lentiviraler RNA im Überstand der HEK293T-Produktionszellen wurde das Lenti-X qRT-PCR Titration Kit der Firma Clontech nach Angaben des Herstellers verwendet und mittels des 7500 Fast Real-Time PCR Systems ausgewertet. Von jeder Probe wurden vier Verdünnungsstufen im Doppelwert gemessen und zur Standardgeraden aus lentiviraler Kontroll-RNA mit einer definierten Anzahl von  $5 \times 10^8$  Kopien/ $\mu\text{l}$  in Bezug gesetzt, um die Anzahl der lentiviralen RNA-Kopien pro ml zu erhalten.

### 3.4 Immunologische Methoden

#### 3.4.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zur Detektion von Zytokinen im Überstand von primären murinen Knochenmarkszellen wurden mausspezifische ELISA der Firma R&D für IL-12p70 und IL-6 verwendet. Hierzu wurde eine 96-Lochplatte (Mikrotiterplatte) mit Primäantikörper (1:180 in PBS verdünnt) über Nacht bei RT beschichtet. Am nächsten Tag wurde der Primäantikörper verworfen, die Mikrotiterplatte für 1 h mit Blockpuffer inkubiert und anschließend die Überstände und Standards im Duplikat aufgetragen und erneut für 2 h bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer wurde ein gegen den Primäantikörper gerichteter fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper (1:180 in Blockpuffer verdünnt) aufgetragen und für 2 h bei RT inkubiert. Nach Entfernen des Zweitantikörpers, fünfmaligem Waschen der Platte und Durchführung einer Meerrettichperoxidase/Substrat-Reaktion konnte der Gehalt der Zytokine quantifiziert werden. Hierzu wurde der entstandene gelbe Überstand in der Mikrotiterplatte spektrometrisch im Photometer SpectraMax M5<sup>e</sup> (Molecular Devices) mit einer Wellenlänge von 450 nm und 570 nm ausgewertet. Die Ratio der Extinktionen wurde zur Standardgeraden in Bezug gesetzt und damit die unbekannte Konzentration der Zytokine in den Proben ermittelt. Die Änderung des Zytokingehalts wurde in Bezug zur unbehandelten Kontrolle und teilweise zum Gesamtproteingehalt der Probe dargestellt.

**ELISA Waschpuffer:**      1x            PBS  
                                 0,05 %        Tween-20

**ELISA Blockpuffer:**    1x            PBS  
                                 1 %            BSA

#### 3.4.2 Cytometric Bead Array (CBA)

Zur Messung von verschiedenen Zytokinen in einer Probe wurde ein mausspezifischer Cytometric Bead Array (CBA) der Firma BD für IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  laut Herstellerangaben im Labor von Prof. Dr. Ralf Schubert (Uniklinik Frankfurt, Deutschland) durchgeführt. Hierbei wurden die mit Primäantikörper beschichteten Beads zusammen mit den Zellüberständen inkubiert, anschließend gewaschen und mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper erneut inkubiert. Es folgte eine durchflusszytometrische Auswertung des gebundenen Zweitantikörpers. Das

resultierende Signal wurde in Bezug zur Standardgeraden gesetzt, um den Zytokingehalt der Proben zu bestimmen.

### 3.4.3 SDS-Page

Zur Auftrennung der Proteine aus dem Gesamtzelllysate wurden 10 % denaturierende Polyacrylamidgele (PAA-Gel) (10 x 8 cm; 1,5 mm) und eine Mini-PROTEAN Cell 3 von Bio-Rad verwendet. Die Proben wurden auf den gleichen Proteingehalt eingestellt, mit Ladepuffer versehen und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 48 µl aufgefüllt. Zum Denaturieren wurden die Proben bei 95 °C für 5 Min. aufgekocht. Anschließend wurden die Proben zusammen mit 3,5 µl Proteinmarker (Protein Marker VI, AppliChem) auf das Gel aufgetragen. Die Proteine auf dem Gel wurden für 20 Min. bei 70 V und 90 Min. bei 100 V bis zur optimalen Auftrennung in 1x Laufpuffer separiert. Anschließend wurde das Gel für den Western Blot verwendet.

<b>Trenngel 10%</b>	<b>Volumen</b>	<b>Einheit</b>	<b>Sammelgel 4%</b>	<b>Volumen</b>	<b>Einheit</b>
Wasser	4,1	ml	Wasser	1,5	ml
Acrylamid	3,3	ml	Acrylamid	330	µl
1,5M TRIS-HCl	2,5	ml	1,5M TRIS-HCl	630	µl
10% SDS	100	µl	10% SDS	25	µl
10% APS	50	µl	10% APS	12,5	µl
TEMED	5	µl	TEMED	2,5	µl

**Tab. 11 Zusammensetzung von SDS-Page Gelen**

<b>Ladepuffer (4xLämmli):</b>	0,677 µl	Aqua dest.
	0,833 µl	1,5 M TRIS-HCl (pH 6,8)
	5,0 ml	Glycerol
	2,0 ml	20 % SDS
	0,4 ml	0,5% Bromphenolblau
	1,0 ml	β-Mercaptoethanol

<b>Laufpuffer (10xSDS):</b>	20 g	SDS
	60 g	TRIS
	288 g	Glycin
	ad 2 l	Aqua dest.

### 3.4.4 Western Blot

Um spezifische Proteinbanden zu detektieren, wurden die unter 3.4.3 hergestellten PAA-Gele zur Herstellung von Western Blots genutzt. Mittels einer Trans-Blot SD Semi-Dry Apparatur (Bio-Rad) wurden die Proteine durch Stromfluss aus dem PAA-

Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Hierzu wurden Filterpapiere mit den Puffern A, B oder C angefeuchtet, die Membran und das Gel gestapelt (Abb. 9) und bei einer konstanten Stromstärke von 0,04 A pro Blot für 45-50 Min. inkubiert.

<b>Puffer A:</b>	0,3 M	TRIS
	20 %	Methanol
		pH 10,4
<b>Puffer B:</b>	25 mM	TRIS
	20 %	Methanol
		pH 10,4
<b>Puffer C:</b>	25 mM	TRIS
	0,04 M	$\epsilon$ -Amino-n-Caprinsäure
	20 %	Methanol
		pH 9,4

Anschließend wurde die Membran aus der Blotapparatur entfernt und für eine Stunde in Waschpuffer 1 oder 2 gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Membran eine Stunde in Blocklösung inkubiert und erneut eine Stunde gewaschen. Es folgte die Inkubation über Nacht mit dem Primärantikörper bei 4 °C (verwendete Antikörper siehe Tab. 12). Am nächsten Tag wurde die Membran eine Stunde gewaschen und anschließend 90 Min. bei RT mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift von einer Stunde wurde die Membran mit 4 ml ECL Western Blotting Substrate (Pierce) für 1 Min. bei RT aktiviert und zusammen mit einem Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) für 1-15 Min. in der Dunkelkammer entwickelt. Um die gleichmäßige Proteinbeladung der Membran für die einzelnen Proben zu überprüfen, wurden die Antikörper durch Inkubation mit 10 ml Restore Western Blot Stripping Buffer (ThermoScientific) für 30 Min. bei 37 °C entfernt und die Membran mit einem Erst- und Zweitantikörper für  $\beta$ -Aktin, wie oben beschrieben, inkubiert.

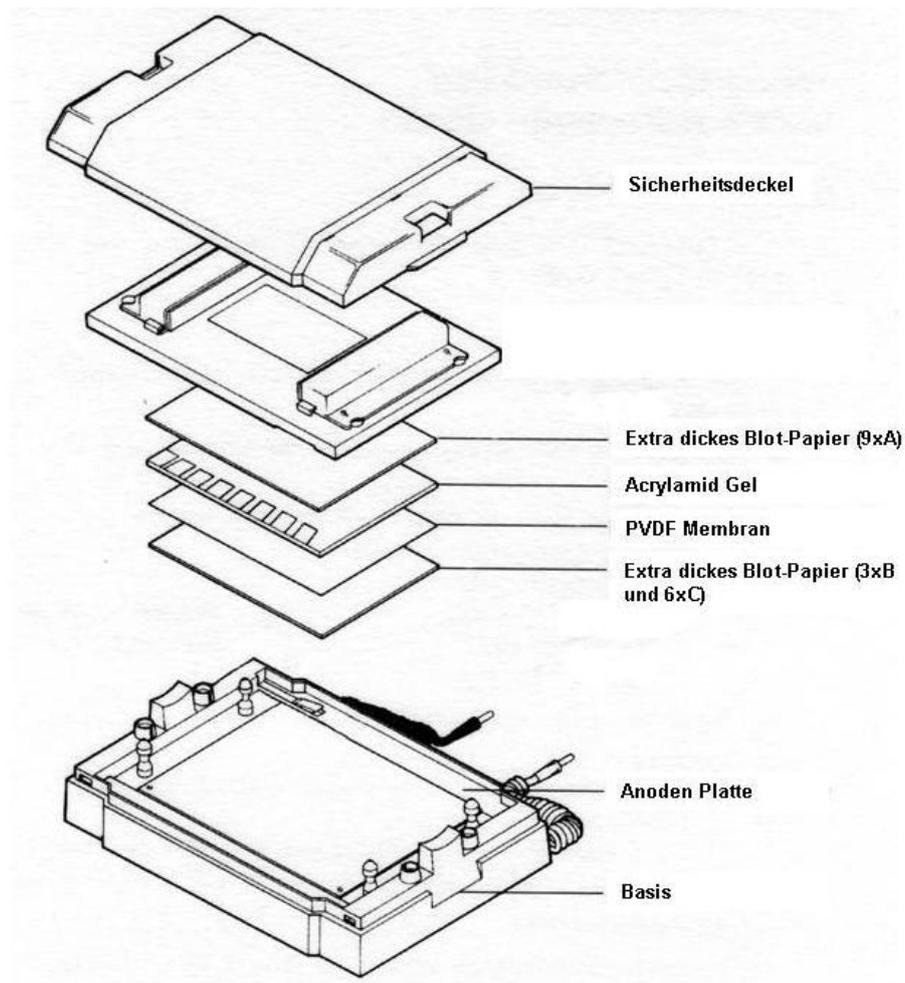


Abb. 9 Aufbau der Western Blot Apparatur

<b>Waschpuffer 1 (PBST):</b>	1x	PBS
	0,05 %	Tween 20 pH 7,5
<b>Waschpuffer 2 (TBST):</b>	100 mM	TRIS
	0,15 M	NaCl
	0,05 %	Tween 20
		pH 7,5
<b>Blocklösung:</b>	5 %	Milchpulver
		PBST oder TBST

Antigen	Wirt	Spezifität	Konz.	Puffer	Firma
m-p47phox	K	M	1:2000	TBST	Millipore #07-500
m-p67phox	K	M	1:2000	TBST	Millipore #07-502
h-TRAF4	K	H, M	1:400	PBST	Epitomics #3226-S
m-IRAK4	K	H, M	1:1000	PBST	Abcam #ab71554
m-TRAF6	K	M	1:1000	PBST	Calbiochem #AP1004
h-IRAK1	K	H, M	1:2000	PBST	Cayman #13843
h-IRAK2	K	H, M	1:1000	PBST	ThermoScientific #PA5-17448
$\beta$ -Aktin	M	H, M	1:6000	PBST	Sigma #A5441
r-IgG HRP	E	K	1:4000	PBST	GE Healthcare #NA934
m-IgG HRP	S	M	1:4000	PBST	GE Healthcare #NA931

**Tab. 12 Antikörper zur Detektion von Proteinen im Western Blot**

K= Kaninchen; M=Maus; E=Esel; S= Schaf; H=Human

### 3.4.5 Far-Western Blot

Für den Far-Western Blot wurden zur Auftrennung der zu untersuchenden Proteine denaturierende PAA-Gele verwendet und der Transfer auf eine PVDF-Membran wurde analog zum Standard Western Blot durchgeführt. Nach dem Transfer und einem Waschschrift von 30 Min. in Waschpuffer 1 wurde die Membran zur Renaturierung der Proteine in AC-Puffer 1-5 gewaschen. Am nächsten Tag, nach einstündiger Inkubation der Membran in Blocklösung, folgte die Inkubation der Membran mit potentiellen rekombinanten Interaktionsproteinen, gelöst in Protein Binding Buffer, für drei Stunden bei RT. Nach einem 30 minütigem Waschschrift folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper gegen das jeweilige Interaktionsprotein. Die darauf folgenden Schritte bis zur Entwicklung entsprechen einem Standard Western Blot (3.4.4). Nach der Detektion der Interaktionsproteine folgt die Detektion der im Gel separierten Proteine und eine Überprüfung der korrekten gleichmäßigen Beladung der Proteinproben über  $\beta$ -Aktin mit vorheriger Entfernung der ersten Antikörper mittels Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce).

AC-Puffer	1	2	3	4	5	Einheit
Milchpulver	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	g
Wasser	0,05	9,5	15,67	18,49	18,8	ml
50 % Glycerol	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	ml
5 M NaCl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	ml
1 M TRIS	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	ml
0,5 M EDTA	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	ml
20 % Tween-20	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	ml
8 M Guanidin-HCl	18,75	9,30	3,13	0,31	-	ml
1 M frisches DTT	25	25	25	25	25	µl
Inkubationszeit	30	30	30	30	über Nacht	Min.
Temperatur	RT	RT	RT	4	4	°C

**Tab. 13 Puffer zur Proteinrenaturierung**

<b>Protein Binding Buffer:</b>	0,5 g	Milchpulver
	18,825 ml	Aqua dest.
	5,0 ml	50 % Glycerol
	0,5 ml	5 M NaCl
	0,5 ml	1 M TRIS
	25 µl	0,5 M EDTA
	0,125 ml	20 % Tween-20
	25 µl	1 M frisches DTT

### 3.4.6 Microscale Thermophoresis

Bei Microscale Thermophoresis (MST) handelt es sich um ein Verfahren, das zur Untersuchung der Interaktionen von Biomolekülen genutzt wird. Hierbei wird ein mikroskopischer Temperaturgradient erzeugt, entlang dessen sich Biomoleküle bewegen. Jede Änderung der Hydratationshülle der Biomoleküle durch eine Interaktion mit einem weiteren Biomolekül oder eine Konformationsänderung, führt zu einer Veränderung der Wanderungsgeschwindigkeit entlang des Temperaturgradienten. Dies kann ausgenutzt werden, um die Bindungsaffinität, Bindungs- oder Aktivitätskinetik dieser Moleküle zu bestimmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion der aus primären murinen Knochenmarkszellen mittels Antikörpern aufgereinigten Proteine p47phox, TRAF4 und TRAF6 mit dem Gerät Monolith NT.115 der Firma NanoTemper Technologies untersucht. Hierzu wurde p47phox nach Angaben des Herstellers mit einem Fluoreszenzmolekül gekoppelt (L005 Monolith NT.115 Protein Labeling Kit) und zusammen mit dem jeweiligen Interaktionspartner in variierenden Konzentrationen von 0 bis 170 nM inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung in Messkapillaren

aufgenommen und nach Angaben des Herstellers gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software NTAnalysis.

### 3.4.7 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Zellsubpopulationen muriner primärer Knochenmarkszellen wurden verschiedene Oberflächenmarker mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gekennzeichnet und die markierten Zellen im Durchflusszytometer CantoII von BD gemessen. Die Inkubation der Zellen mit den Antikörpern erfolgte nach der siebentägigen Ausdifferenzierung und Stimulation in FACS Puffer. Es wurden pro Probe  $0,5 - 2 \times 10^6$  Zellen verwendet, welche mit Fc-Block für 5 Min. bei 4 °C inkubiert wurden, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Fc-Rezeptoren zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen mit den in Tabelle 13 aufgeführten Antikörpern für 30 Min. bei 4 °C gefärbt. Nach zwei Waschschritten wurden die Zellpellets in Fixierpuffer aufgenommen und im CantoII gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo von Tree Star Inc.

**FACS Puffer:** 1x PBS  
1 % FCS  
0,1 % NaN<sub>3</sub>

**Fixierpuffer:** 1x PBS  
1 % FCS  
0,1% NaN<sub>3</sub>  
1% Paraformaldehyd

Antigen	Farbstoff	Firma
CD11c	Allophycocyanin (APC)	BD Bioscience #550261
Hamster IgG1	Allophycocyanin (APC)	BD Bioscience #553956
CD8α	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Southern Biotech #1550-02
Ratte IgG2a	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	AbD Serotec #MCA1124FT
CD3	Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP)	BD Bioscience #553067
Hamster IgG2a	Peridinin Chlorophyll-Protein (PerCP)	R&D #IC066
XCR1	Phycoerythrin (PE)	RKI Berlin

**Tab. 14 Fluoreszenzmarkierte Antikörper für die FACS-Färbung**

## 4 ERGEBNISSE

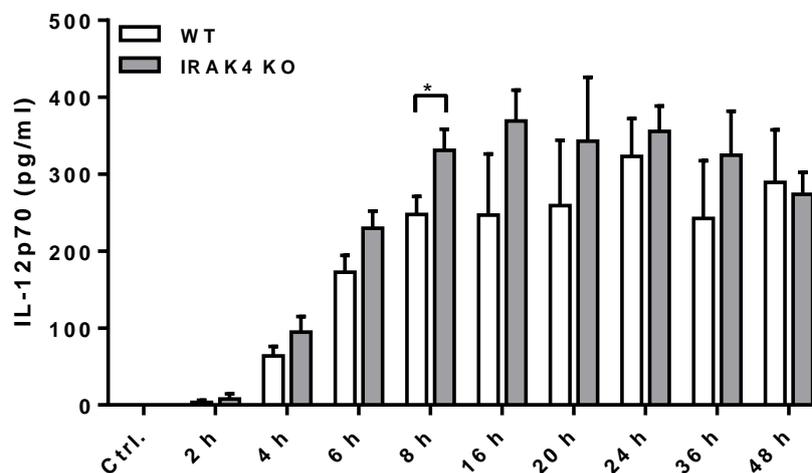
Ausgangspunkt dieses Dissertationsprojektes stellten Vorbefunde des Labors dar, die eine spezifische und differenzielle TLR-abhängige Expressionsregulation von Interleukin-12 und Interleukin-23, im Detail ihrer Untereinheiten p35, p19 und p40, in dendritischen Zellen zeigten. Abhängig vom Subtyp der dendritischen Zelle [56,57] und den bisher untersuchten Modulatoren, p47phox [1] und Sphingosin-1-Phosphat [58], stellte sich insbesondere die Regulation der IL-12p70 Untereinheiten p35 und p40 als interessante Fragestellung dar. Die experimentellen Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen in vier Abschnitten die Analyse der TLR-nahen Signalmoleküle der IRAK-Familie (4.1), der näheren Beschreibung der DC Subpopulation mit einer p47-abhängigen IL-12 Regulation (4.2.), der Charakterisierung von siRNA und shRNA Techniken zur Suppression von IRAK4 oder p47phox (4.3), sowie ersten Ergebnissen zu molekularen Interaktionen verschiedener Komponenten der membrannahen TLR-Signalkaskade (4.4).

### 4.1 Untersuchungen zur Modulation von IL-12p70 durch IRAK4

Im ersten Teil der Ergebnisse wurde die Produktion des Zytokins IL-12p70 nach der Stimulation GM-CSF differenzierter DCs aus dem Knochenmark von WT und IRAK4<sup>-/-</sup> Mäusen sowohl auf Proteinebene im ELISA, als auch auf mRNA-Ebene untersucht.

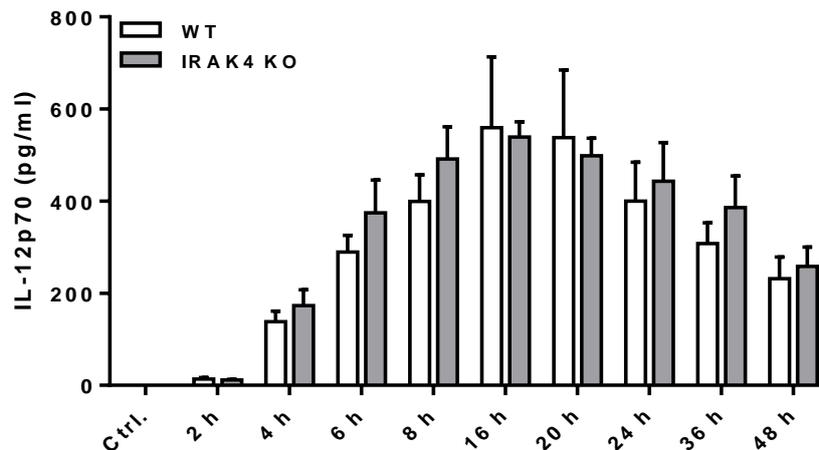
#### 4.1.1 Unterschiedliche Auswirkungen der IRAK4-Defizienz für die TLR9- versus TLR4-abhängige IL-12 Expression

In den Ausgangsversuchen wurden primäre murine Knochenmarkszellen aus WT und IRAK4<sup>-/-</sup> mit 2,5µM CpG und 1µg/ml LPS für 2, 4, 6, 8, 16, 20, 24, 36 und 48 h stimuliert. Anschließend wurde IL-12p70 in den Überständen per ELISA gemessen. Es konnte eine verstärkte Produktion von IL-12p70 nach Stimulation des TLR9 mit CpG in den IRAK4-defizienten DCs beobachtet werden, die zum Zeitpunkt 8 h signifikant ausfällt und bis 24 h tendenziell vorhanden ist (Abb. 10). Für die Stimulation des TLR4 mit LPS konnte kein Unterschied zwischen den beiden Mauslinien festgestellt werden (Abb. 11).



**Abb. 10 IL-12p70 Sekretion nach TLR9-Stimulation in DCs**

Die DCs wurden mit 2,5µM CpG für die angegebenen Zeiten bzw. als Kontrollwert (Ctrl.) unbehandelt inkubiert. Die Messwerte sind normalisiert auf den Kontrollwert als Zytokinkonzentration  $\pm$ SEM dargestellt. n=5, \* p<0,05, unabhängiger t-Test

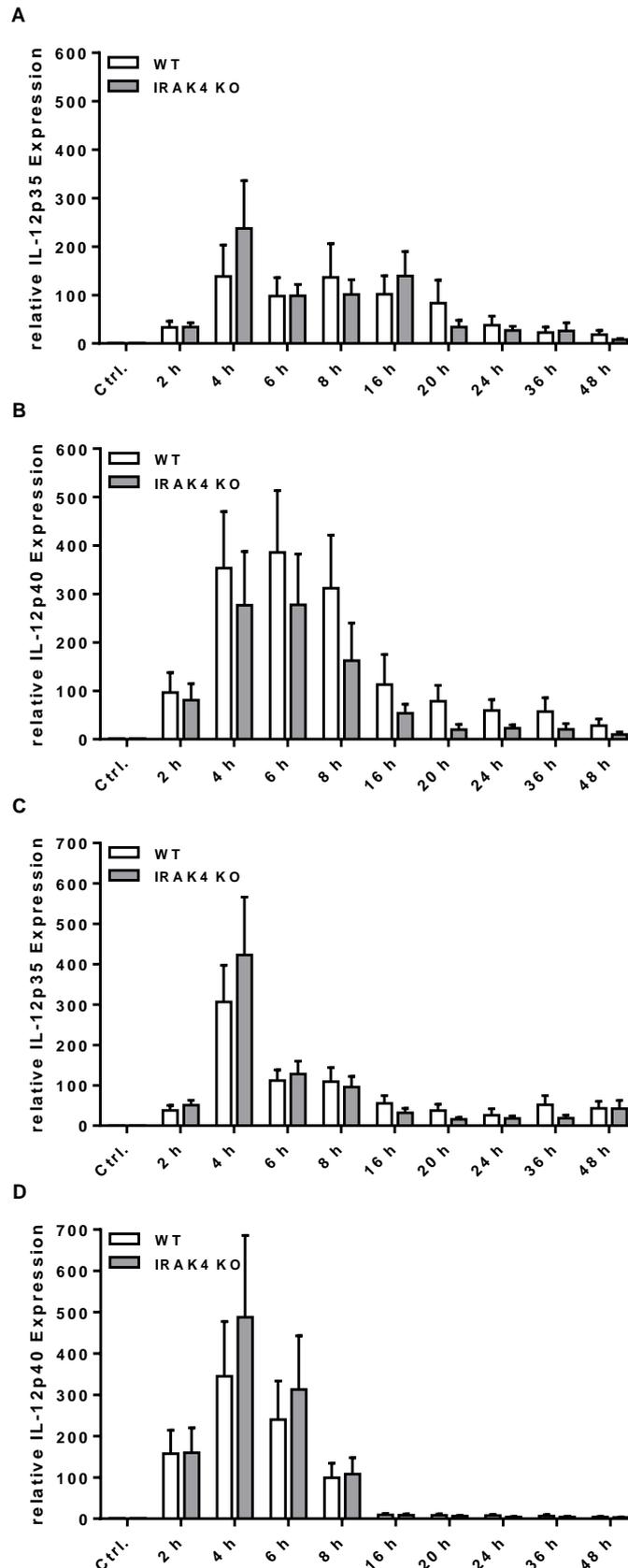


**Abb. 11 IL-12p70 Sekretion nach TLR4-Stimulation in DCs**

Die DCs wurden mit 1µg/ml LPS für die angegebenen Zeiten bzw. als Kontrollwert (Ctrl.) unbehandelt inkubiert. Die Messwerte für IL-12p70 sind normalisiert auf den Kontrollwert als Zytokinkonzentration  $\pm$ SEM dargestellt. n=5

#### 4.1.2 Regulation der IL-12 Untereinheiten p35 und p40 durch IRAK4

Zusätzlich zum heterodimeren Protein wurde die mRNA der Untereinheiten p35 und p40 von IL-12p70 in IRAK4<sup>-/-</sup> DCs nach Stimulation mit CpG gemessen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es nach 4 h Stimulation mit CpG zu einem kurzfristigen Anstieg der p35-mRNA sowohl bei den DCs der IRAK4<sup>-/-</sup> als auch der WT Mauslinie kam. Jedoch konnte kein Unterschied zwischen den Mauslinien festgestellt werden. Die Expression von p40 wurde ebenfalls heraufreguliert, ohne dass ein Unterschied zwischen WT und IRAK4<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt werden konnte. Allerdings war die Expression in den WT DCs zu allen Zeitpunkten tendenziell stärker (Abb. 12 A, B). Weiterhin wurden die DCs über TLR2/4 durch LPS stimuliert. Dabei konnte weder für die Untereinheit p35, noch für die Untereinheit p40 ein signifikanter Unterschied zwischen den WT und IRAK4<sup>-/-</sup> Mauslinien beobachtet werden (Abb. 12 C, D).

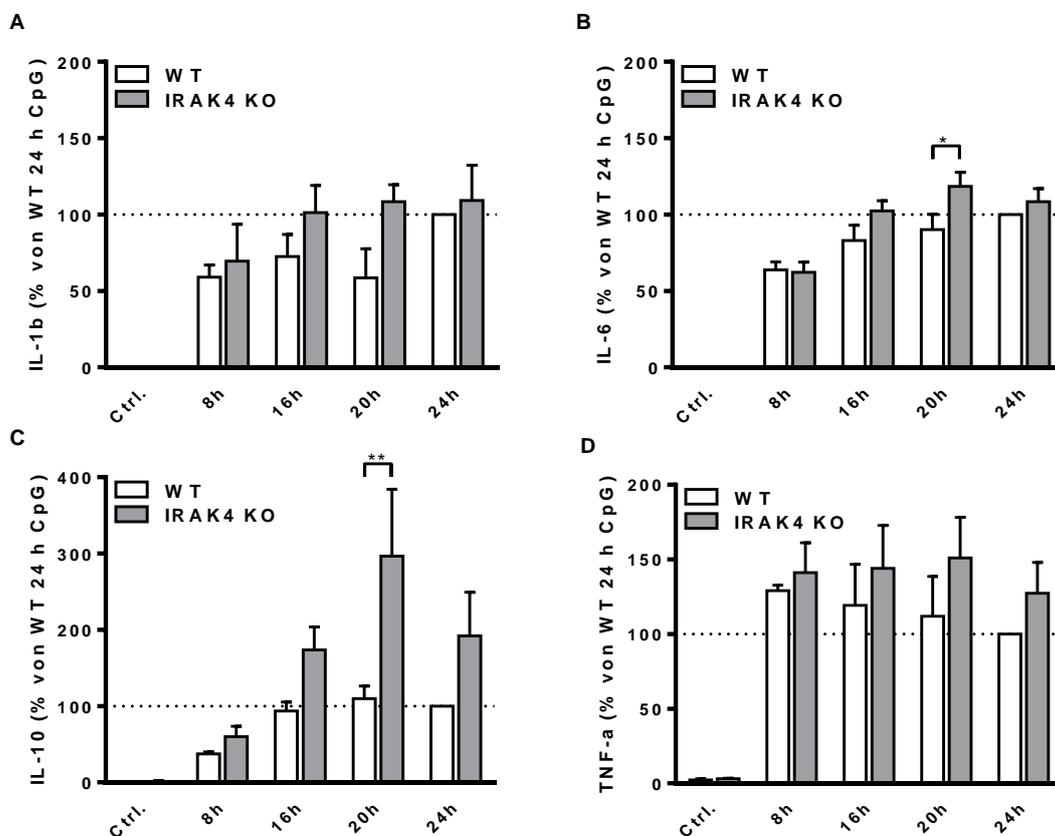


**Abb. 12 mRNA-Expression der IL-12 Untereinheiten nach TLR-Stimulation**

Die DCs wurden mit 2,5  $\mu$ M CpG (A, B) und 1  $\mu$ g/ml LPS (C, D) für die angegebenen Zeiten bzw. als Kontrollwert (Ctrl.) unbehandelt inkubiert. Die Messwerte für IL-12p35 und IL-12p40 sind normalisiert auf die Expression der Kontroll-mRNA GAPDH und relativ zur Kontrolle als  $\pm$ SEM dargestellt. n=5.

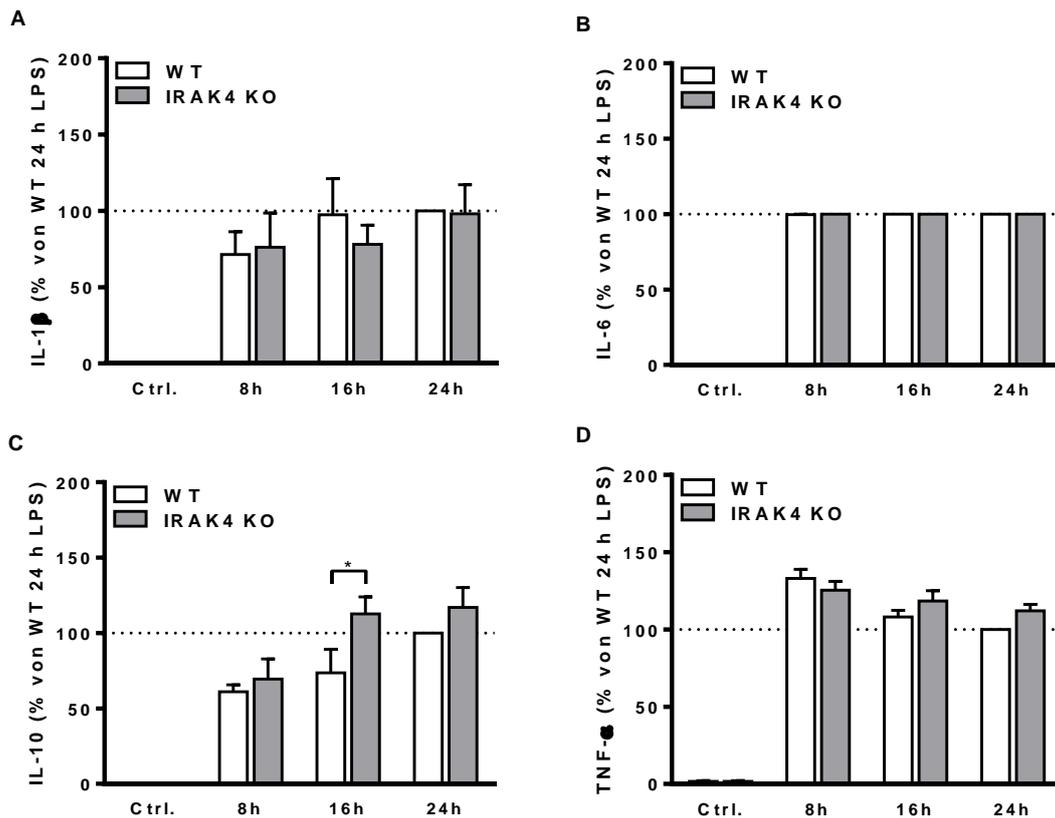
### 4.1.3 Einfluss von IRAK4 auf die Regulation von weiterer Zytokine

Um den Effekt von IRAK4 auf die TLR-Signalwege weiter zu überprüfen, wurden zusätzliche Zytokine im Überstand der stimulierten DCs mittels CBA untersucht. Hierzu wurden Proben der 8, 16, 20 und 24 h CpG-Stimulationen und der 8, 16, und 24 h LPS-Stimulationen auf ihren IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-4 und IFN $\gamma$  Gehalt überprüft. IL-4 und IFN $\gamma$  konnte weder bei LPS- noch bei CpG-Stimulation in den Überständen von WT und IRAK4<sup>-/-</sup> DCs gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Unter TLR9-Stimulation mit CpG zeigte sich ein Anstieg der Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  nach 20 h in den DCs der IRAK4<sup>-/-</sup> für alle Zeitpunkte. Dieser Anstieg war vor allem nach 20 h und verstärkt für IL-6 und IL-10 zu beobachten (Abb. 13). Die Produktion von IL-10 war nach Stimulation mit LPS bei IRAK4<sup>-/-</sup> DCs im Vergleich zu WT Zellen signifikant erhöht. Bei allen weiteren Zytokinen konnte kein Unterschied zwischen WT und IRAK4<sup>-/-</sup> DCs beobachtet werden. Aufgrund der Sättigung des Assays konnte trotz weiterer Verdünnungsversuche die Produktion von IL-6 nicht quantitativ bestimmt werden (Abb. 14).



**Abb. 13 Zytokinsekretion nach TLR9-Stimulation in DCs**

Die DCs wurden mit 2,5 $\mu$ M CpG für die angegebenen Zeiten bzw. als Kontrollwert (Ctrl.) unbehandelt inkubiert. Die Messwerte für IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), IL-10 (C) und TNF- $\alpha$  (D) sind relativ zur 24 h Stimulation des WT als Zytokinkonzentration  $\pm$ SEM dargestellt. n=3-4, \* p<0,05, \*\* p<0,01, 2way ANOVA (B/C).



**Abb. 14 Zytokinsekretion nach TLR4-Stimulation in DCs**

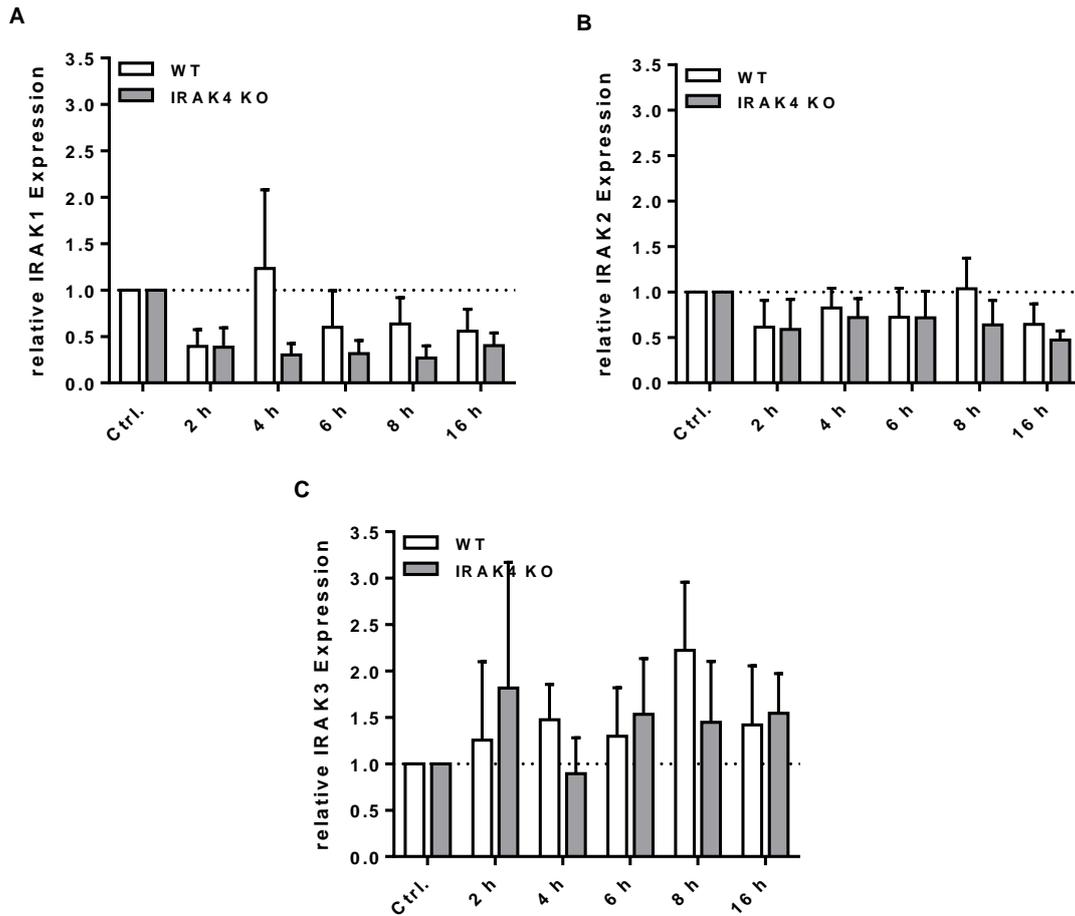
Die DCs wurden mit 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  LPS für die angegebenen Zeiten bzw. als Kontrollwert (Ctrl.) unbehandelt inkubiert. Die Messwerte für IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), IL-10 (C) und TNF- $\alpha$  (D) sind relativ zur 24 h Stimulation des WT als ZytokinKonzentration  $\pm$ SEM dargestellt. n=5, \* p<0,05, 2way ANOVA.

#### 4.1.4 Einfluss weiterer IRAK-Proteine auf die IL-12p70 Produktion

Bei IRAK4 handelt es sich um das neueste Protein der IRAK-Proteinfamilie, zu der außerdem IRAK1, IRAK2 und IRAK3 (IRAKM) gehören. Die IRAK-Proteine dienen als Adaptermoleküle für TLR-Signalwege und jedes Protein hat eine spezifische Rolle innerhalb des Signalweges. Es wird angenommen [51,59], dass nach der TLR-Stimulation MyD88 an die TIR-Domäne bindet und somit die DD von MyD88 für die Bindung mit IRAK1 zur Verfügung steht. In ruhenden Zellen liegt IRAK1 unphosphoryliert und gebunden an Tollip vor, welches nach der Bindung von IRAK1 an MyD88 dissoziiert. IRAK1 interagiert nach der Bindung an MyD88 mit IRAK4 und dieser Komplex aktiviert TRAF6. Das nun polyubiquitinylierte TRAF6 ermöglicht die Aktivierung von TAK1, welches IKK $\beta$  und MKK6 phosphoryliert. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B, p38 und JNK. Gleichzeitig zur Interaktion des IRAK1/4-Komplexes mit TRAF6 kommt es außerdem zu einer Phosphorylierung von IRAK1 durch IRAK4. Dem folgt eine Autophosphorylierung von IRAK1, welche zu

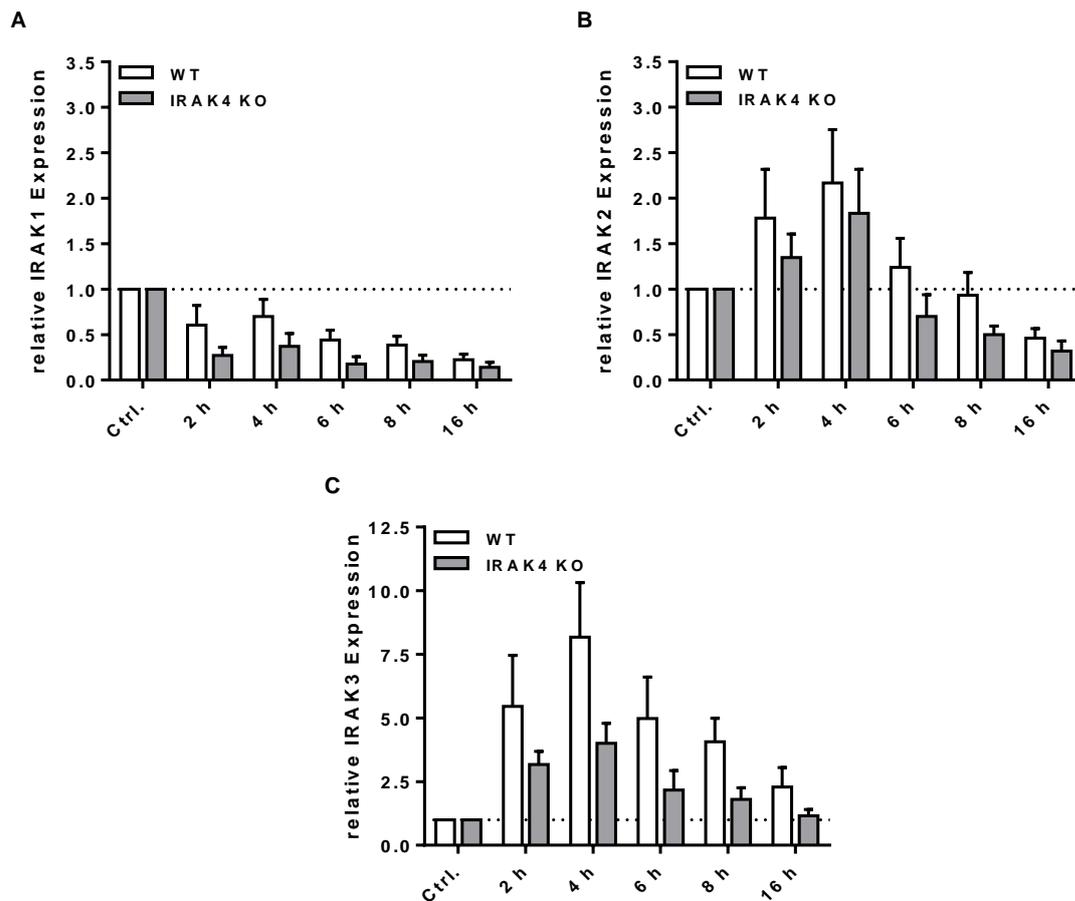
einer Konformationsänderung führt und IRAK1 vom Komplex dissoziieren lässt. Das dissoziierte IRAK1 wird im Zytoplasma degradiert. Es wird vermutet, dass IRAK2 redundant zu IRAK1 in der Anfangsphase der Stimulation agiert. Jedoch scheint IRAK2 kritisch für die Aufrechterhaltung des Signals zu sein, wenn IRAK1 durch die Phosphorylierung von IRAK4 und die damit eingeleitete Ubiquitinylierung abgebaut wird [60]. Bei IRAKM handelt es sich um das einzige kinaseinaktive Mitglied der IRAK-Familie, das vermutlich als negativer Regulator des TLR-Signalweges agiert [61,62]

Ein Wegfall von IRAK4 könnte daher zur Folge haben, dass die Funktion anderer IRAK-Proteine inhibiert wird oder ein anderes Protein der IRAK-Familie die Funktionen von IRAK4 übernimmt. Um den Einfluss der IRAK4-Defizienz auf die anderen IRAK-Proteine zu untersuchen, wurde die mRNA von IRAK1, IRAK2 und IRAK3 mittels qRT-PCR in den mit CpG oder LPS stimulierten DCs der WT und IRAK4<sup>-/-</sup> Mäuse gemessen. Die mit CpG stimulierten DCs zeigten hierbei keinen signifikanten Unterschied in der Expression der IRAK-Proteine zwischen den beiden Mauslinien (Abb. 15). Tendenziell zeigt sich eine stärkere Expression von IRAK1 und IRAK2 in WT DCs. Nach der TLR4 Stimulation mit LPS konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mauslinien festgestellt werden, jedoch konnte eine tendenzielle Erhöhung der Expression aller IRAK mRNAs in den WT DCs beobachtet werden. Diese erhöhte Expression war besonders deutlich für IRAK3 (Abb. 16).



**Abb. 15 mRNA-Expression der IRAK-Proteine nach TLR9-Stimulation**

Die DCs wurden mit 2,5 $\mu$ M CpG für die angegebenen Zeiten bzw. als Kontrollwert (Ctrl.) unbehandelt inkubiert. Die Messwerte für IRAK1 (A), IRAK2 (B) und IRAK3 (C) sind normalisiert auf die Expression der Kontroll-mRNA GAPDH und relativ zum Kontrollwert als  $\pm$ SEM dargestellt. n=5.



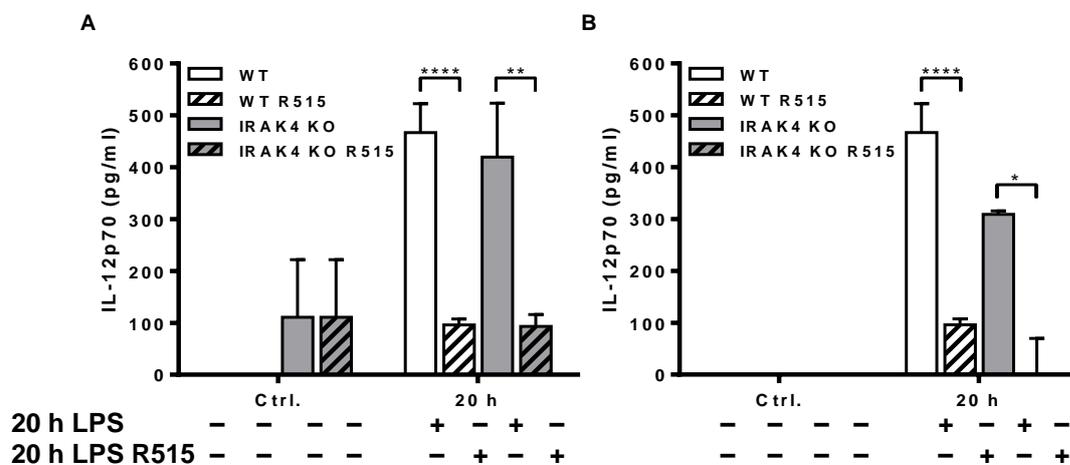
#### Abb. 16 mRNA-Expression der IRAK-Proteine nach TLR4-Stimulation

Die DCs wurden mit 1 µg/ml LPS für die angegebenen Zeiten bzw. als Kontrollwert (Ctrl.) unbehandelt inkubiert. Die Messwerte für IRAK1 (A), IRAK2 (B) und IRAK3 (C) sind normalisiert auf die Expression der Kontroll-mRNA GAPDH und relativ zum Kontrollwert als  $\pm$ SEM dargestellt. n=5.

#### 4.1.5 Einfluss anderer Stimuli auf die IL-12p70 Produktion

Die beiden hauptsächlich betrachteten Signalwege dieser Arbeit, TLR9 und TLR4, befinden sich zumindest zu Beginn der Stimulation in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle. Bei den Liganden von TLR4 handelt es sich hauptsächlich um LPS, aber auch strukturelle Proteine von Viren, Mannan und Glykoinositolphospholipide von *Trypanosoma* können durch TLR4 gebunden werden [63]. Nach der Ligandenerkennung durch TLR4 an der Zelloberfläche erfolgt die Signalweiterleitung durch MyD88, welche durch die Rezeptorinternalisierung in frühe Endosomen beendet und durch die Weiterleitung des Signals mit TRIF ersetzt wird [64–66]. Nach der Migration von TLR4 in späte Endosomen wird das TRIF-Signaling unterbrochen und der Signalkomplex abgebaut [67]. Bei TLR9 handelt es sich dagegen um einen intrazellulären Rezeptor, der alle Arten, vor allem aber doppelsträngige DNA,

binden kann [68], welches in Versuchen durch die Stimulation mit synthetischen CpG-Oligonukleotide ausgenutzt wird. TLR9 wird im endoplasmatischen Retikulum, Endosomen und Lysosomen exprimiert, jedoch erfolgt die Aktivierung nur innerhalb angesäuerter, endolysosomaler Kompartimente [68]. Die Signalweiterleitung erfolgt ausschließlich über MyD88. Die Liganden von TLR2, einem weiteren extrazellulären Rezeptor, sind sowohl Lipoproteine, Lipoteichonsäure und Peptidoglykan als auch strukturelle Virusproteine, so dass bei der Verwendung von unreinem LPS, welches weitere bakterielle Zellwandkomponenten enthält, die Möglichkeit besteht, auch TLR2 zu stimulieren. Um den Einfluss von TLR2 auf die Regulation der IL-12p70-Produktion durch IRAK4 auszuschließen, wurde reines LPS (R515 *E.coli*) für die ausschließliche Stimulation von TLR4 eingesetzt. DCs der WT und IRAK4<sup>-/-</sup> Mauslinien wurden mit diesem Stimulus für 20 h behandelt und IL-12p70 im Überstand per ELISA gemessen. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen reinem und unreinem LPS bei der Induktion der IL-12p70-Produktion in WT und IRAK4<sup>-/-</sup> DCs festgestellt werden, jedoch kein Unterschied zwischen den Mauslinien (Abb. 17).

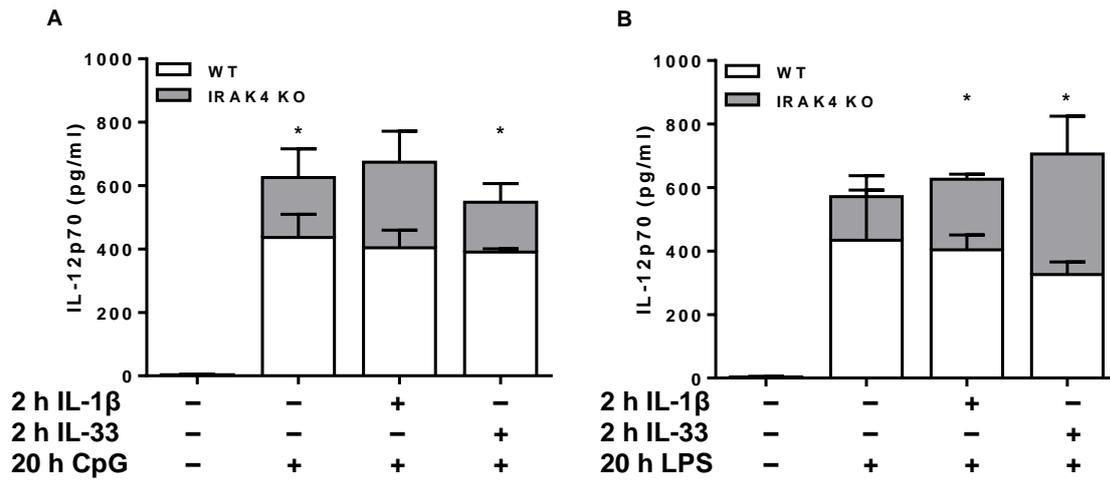


#### Abb. 17 IL-12p70 Sekretion nach Stimulation mit reinem LPS

Die DCs wurden mit 1µg/ml LPS bzw. 1µg/ml LPS R515 für 20 h bzw. als Kontrollwert (Ctrl.) unbehandelt inkubiert. Die Messwerte sind absolut (A) und normalisiert auf den Kontrollwert (B) als Zytokinkonzentration ±SEM dargestellt. n=2-4, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\*\* p<0,0001, 2way ANOVA.

#### 4.1.6 Einfluss des IL-1 bzw. IL-33 Signalweges auf die IL-12p70 Produktion

Bei den TLR-Signalkomponenten handelt es sich um Strukturen, die für viele Signalkaskaden benötigt werden. MyD88 wird von allen Signalwegen mit der Ausnahme von TLR3 zur Signalweiterleitung genutzt. TLR7 und 9 sind vollkommen auf MyD88 als Adaptorprotein angewiesen, die anderen Signalwege nutzen zusätzlich TRIF oder TRAM, welche ebenfalls von TLR3 [55] genutzt werden. Im weiteren Verlauf der Signalwege werden die Proteine der IRAK-Familie (4.1.4) [47,60], TRAF6, TAK1, NEMO, TAB1 und 2, IKK $\alpha$  und  $\beta$ , MAPK, JNK, p38, ERK1 und 2 und I $\kappa$ B genutzt und die Signalweiterleitung resultiert in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP1, IRF1/5 oder NF- $\kappa$ B [68]. Im Fall von TLR3 erfolgt nach der Rekrutierung von TRIF die Weiterleitung über TRAF3/6 und RIP 1 und 3, welches wiederum zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und MAPKs führt, woraus die Produktion proinflammatorischer Zytokine resultiert [69]. Analog zu den TLRs nutzen ebenfalls der IL-1 [70] bzw. IL-33 Signalweg [71] diese Signalkomponenten. So kann eine Stimulation mit IL-1 oder IL-33 Adaptormoleküle des Signalapparates zur Produktion von IL-12p70 betreffen, was zu einer Depletion oder verringerten Funktion der IL-12p70 Signalkaskade führen könnte. Um diese These zu überprüfen, wurden WT und IRAK4<sup>-/-</sup> DCs mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  bzw. 100 ng/ml IL-33 für 2 h vorstimuliert und anschließend nach Zugabe von CpG oder LPS für weitere 20 h inkubiert. Der Gehalt an IL-12p70 im Überstand wurde mittels ELISA bestimmt. Bei diesen Versuchen konnte beobachtet werden, dass die Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  sowohl nach CpG-, wie auch nach LPS-Stimulation, zu einem Anstieg von IL-12p70 in den IRAK4<sup>-/-</sup> DCs führt und zu einem Abfall in den WT DCs. Die Vorstimulation mit IL-33 führt bei der CpG-Stimulation zu einem leichten Abfall von IL-12p70 in WT und IRAK4<sup>-/-</sup> DCs. Bei der LPS-Stimulation war eine gesteigerte Produktion von IL-12p70 in IRAK4<sup>-/-</sup> DCs, jedoch nicht in WT DCs zu beobachten. Der Effekt der gesteigerten IL-12p70 Produktion in IRAK4<sup>-/-</sup> DCs nach CpG-Stimulation (4.1.1) konnte in diesen Versuchen bestätigt werden. Diese negative Rückkopplung von IRAK4 auf den TLR-Signalweg konnte bei alleiniger LPS-Stimulation in den Ausgangsversuchen (4.1.1) nicht beobachtet werden, trat jedoch bei LPS-Stimulation nach Vorinkubation durch IL-1 $\beta$  und IL-33 in diesen Versuchen auf. (Abb. 18).



### Abb. 18 IL-12p70 Sekretion nach TLR-Kostimulation in DCs

Die DCs wurden mit 2,5 $\mu$ M CpG (A) und 1 $\mu$ g/ml LPS (B) für 20 h bzw. als Kontrollwert (Ctrl.) unbehandelt inkubiert, bei teilweiser Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  oder IL-33. Die Messwerte sind normalisiert auf den Kontrollwert als Zytokinkonzentration  $\pm$ SEM dargestellt. n=2-3, unabhängiger t-Test, \* p<0,05.

## **4.2 Charakterisierung von DCs, welche für die p47phox- bzw. IRAK4-abhängige Modulation von IL-12p70 verantwortlich sind**

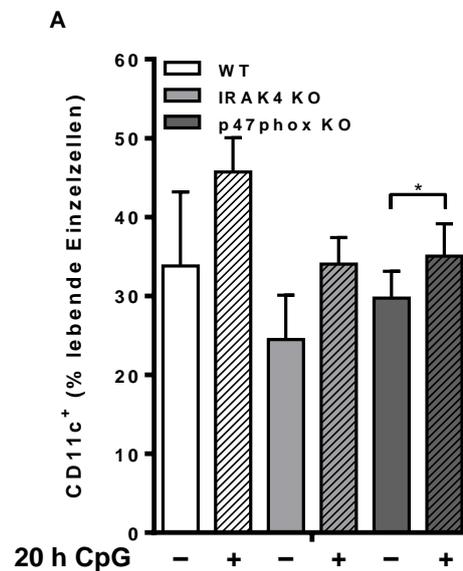
In den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Induktion der IL-12p70 Produktion in primären Knochenmarkszellen von p47phox<sup>-/-</sup> Mäusen hauptsächlich durch die Subpopulation der CD11c-positiven Zellen erfolgt [1]. Da durch den Marker CD11c neben DCs auch andere Zellpopulationen, wie aktivierte Monozyten oder Gewebemakrophagen, markiert werden [72], wurde für die weitere Charakterisierung der Zellen eine Kombination von Zelloberflächenmarkern und Chemokinrezeptoren untersucht. Der Chemokinrezeptor XCR1 wurde als spezifischer Marker für CD8<sup>+</sup> DCs in allen lymphoiden und nicht-lymphoiden Geweben identifiziert [73]. Durch die Verwendung dieses sehr spezifischen Markers zusammen mit CD8 $\alpha$ , welches als Homodimer von DCs exprimiert wird und als Co-Rezeptor bei der Präsentation von Antigenen durch MHC-I-Komplexe dient, und CD3, welches ein T-Zell Co-Rezeptor darstellt, sollten die Subpopulationen der primären Knochenmarkszellen der IRAK4<sup>-/-</sup> Mäuse ebenfalls untersucht werden.

### **4.2.1 Durchflusszytometrische Untersuchung der Subpopulationen primärer muriner Knochenmarkszellen**

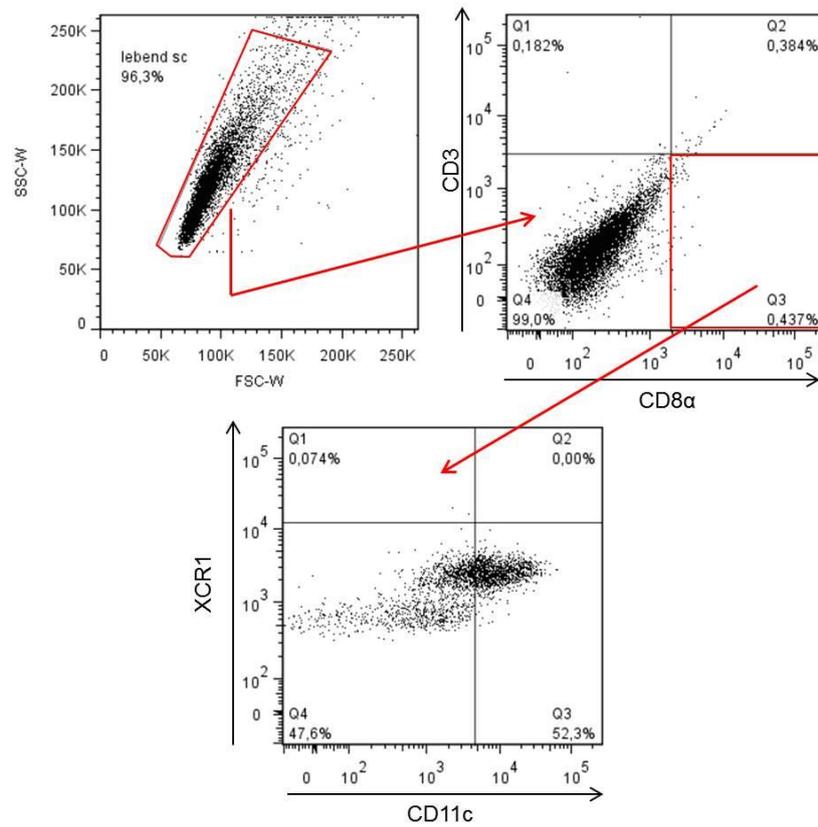
In ersten Versuchen sollte festgestellt werden, ob ein Unterschied in der Größe der CD11c-positiven Subpopulation der DCs von WT, p47phox KO und IRAK4 KO sowohl mit, als auch ohne CpG-Stimulation besteht. Hierzu wurden DCs nach der Ausdifferenzierung für 20 h mit und ohne CpG inkubiert, anschließend mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD11c gefärbt und im Durchflusszytometer ausgewertet. Dabei konnte beobachtet werden, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Größe der Subpopulation der CD11c-positiven DCs zwischen den einzelnen Mauslinien gab. Die Stimulation mit CpG führte bei allen Mauslinien zu einem tendenziellen Anstieg der CD11c-positiven Zellen, welcher jedoch nur für die p47phox KO signifikant war (Abb. 19A).

In weiteren Versuchen sollten Unterschiede in den vorhandenen Subpopulationen der DCs in den unterschiedlichen Mauslinien weiter eingegrenzt werden. Dazu wurden die primären Knochenmarkszellen nach der Ausdifferenzierung 20 h mit CpG bzw. ohne Stimulus inkubiert und anschließend mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD8 $\alpha$ , CD3, CD11c und XCR1 gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Die

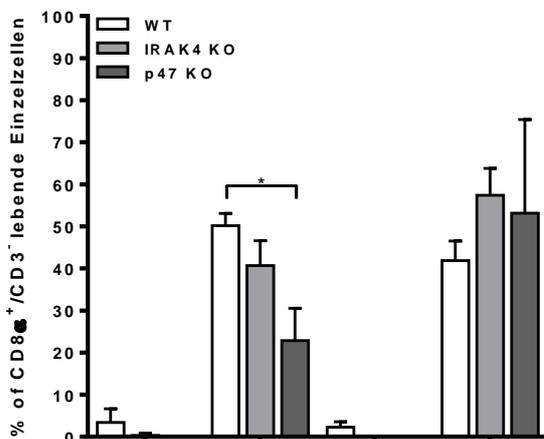
Messdaten wurden zuerst auf alle lebenden Einzelzellen eingegrenzt und anschließend die CD8 $\alpha$  positiven Zellen herausgenommen. Von den CD8 $\alpha$  positiven Zellen wurden die CD3-positiven Zellen separiert, um CD8-positive T-Zellen auszuschließen. Die CD8 $\alpha$ -positive/CD3-negative Fraktion wurde dann auf CD11c-positive und -negative bzw. XCR1-positive und -negative Zellen überprüft (Abb. 19B). Hierbei war zu sehen, dass sich die Mauslinien lediglich in dem Gehalt der CD11c positiven/XCR1 negativen Fraktion der CD8 $\alpha$  positiven/CD3 negativen Subpopulation ohne Behandlung mit einem Stimulus signifikant unterschieden (Abb. 19C). Nach Zugabe von CpG bestand kein Unterschied in den Subpopulationen (Abb. 19D).



## B Gating-Strategie



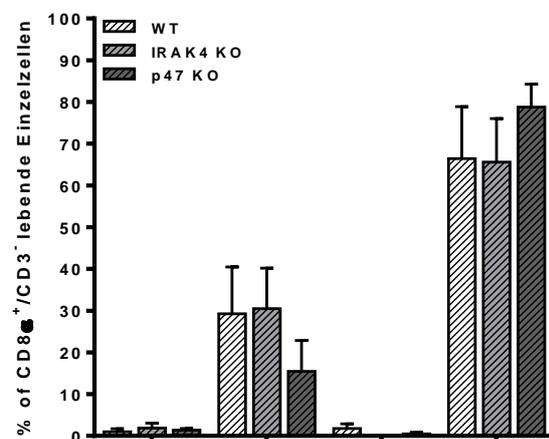
## C



CD11c  
XCR1

+ + - -  
+ - + -

## D



20 h CpG

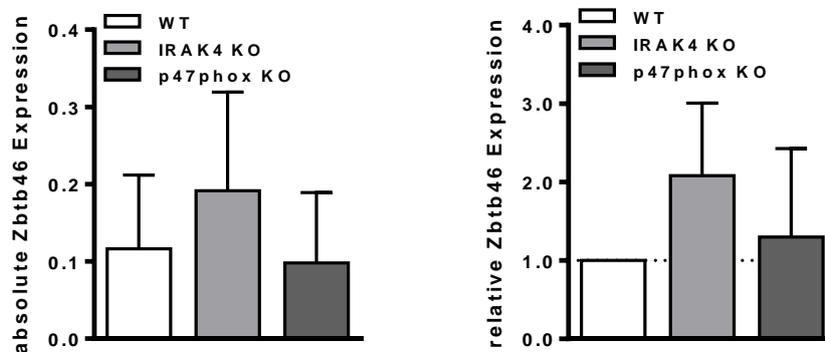
+ + - -  
+ - + -  
+ + + +

## Abb. 19 Subpopulationen primärer muriner Knochenmarkszellen

Die DCs wurden mit 2,5 $\mu$ M CpG für 20 h bzw. unbehandelt inkubiert und anschließend mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern für die angegebenen Oberflächenmarker gefärbt. Die durchflusszytometrischen Messwerte sind prozentual als lebende Einzelzellen (A) bzw. CD8 $\alpha$  positive, CD3 negative, lebende Einzelzellen (C, D)  $\pm$ SEM dargestellt. n=4, unabhängiger t-Test, \* p<0,05.

#### 4.2.2 Einfluss der Expression von Zbtb46 auf die IL-12p70 Produktion in IRAK4<sup>-/-</sup>, p47phox<sup>-/-</sup> und WT DCs

Da die Induktion der IL-12p70 Produktion in IRAK4<sup>-/-</sup> und p47phox<sup>-/-</sup> Mäusen nicht durch die unterschiedlichen Subpopulationen der primären Knochenmarkszellen anhand von Oberflächenmarkern erklärt werden konnte, wurde in weiteren Versuchen die Expression des Transkriptionsfaktors Zbtb46 untersucht. Hierzu wurden ausdifferenzierte DCs für 20 h unbehandelt inkubiert und die Expression von Zbtb46 mittels qRT-PCR bestimmt. In den primären Knochenmarkszellen der IRAK4<sup>-/-</sup> Mäuse konnte eine tendenzielle Erhöhung der Zbtb46 Expression beobachtet werden, welche jedoch keine Signifikanz erreichte (Abb. 20).



**Abb. 20 Expression von Zbtb46 in primären murinen Knochenmarkszellen**

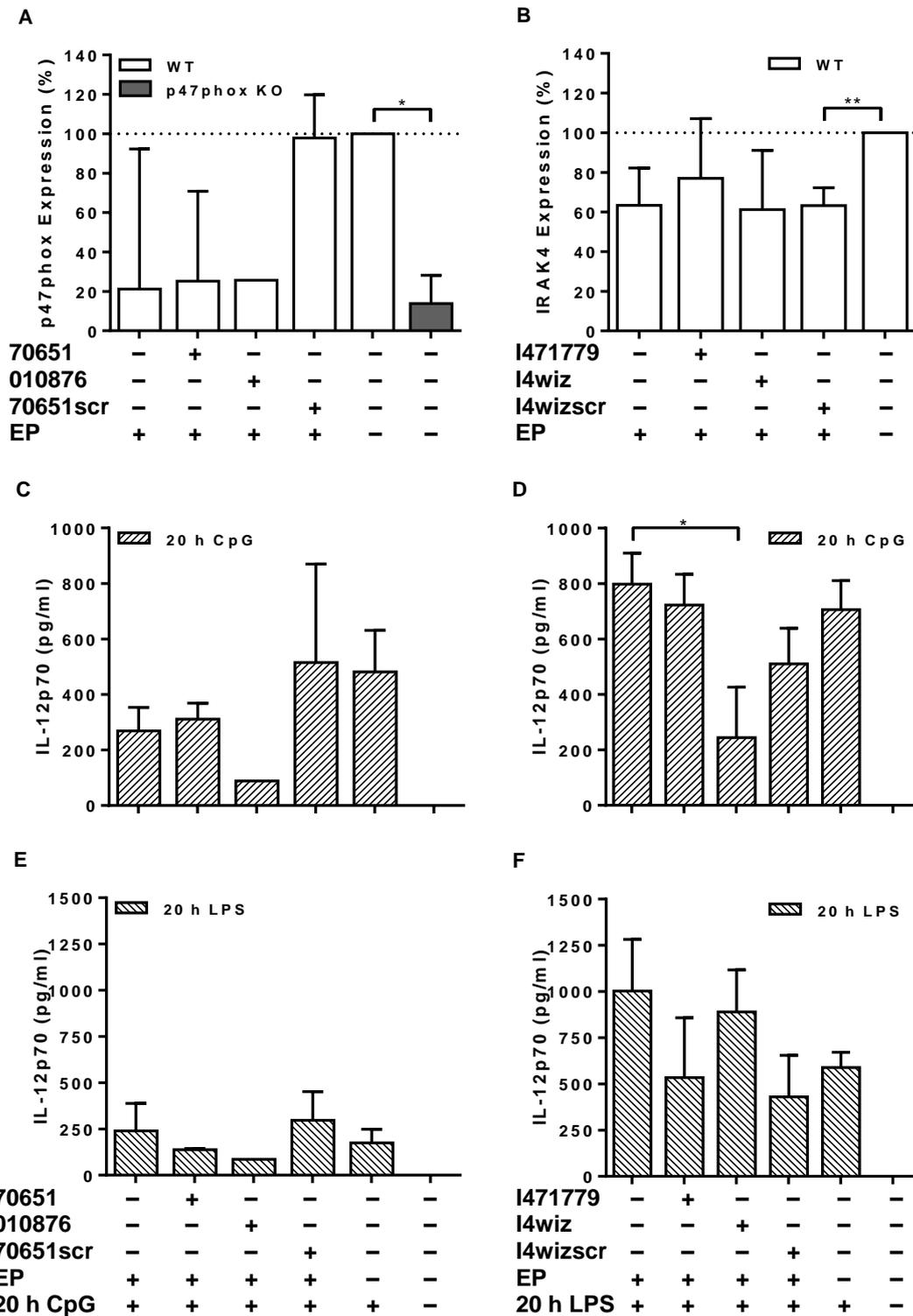
Die DCs wurden sieben Tage ausdifferenziert und unbehandelt für 20 h inkubiert. Die Messwerte für Zbtb46 sind normalisiert auf die Expression der Kontroll-mRNA Csnk2a2 als Absolutwerte (A) und relativ zum WT (B)  $\pm$ SD dargestellt. n=3-7.

### **4.3 Etablierung von Methoden zum Einbringen von shRNA und siRNA in DCs zur Modulation der p47phox- und IRAK4-Expression**

Die Nutzung von genetisch veränderten Mauslinien stellt eine etablierte und anerkannte Methode zur Untersuchung von Funktionen und Interaktionen bestimmter Proteine dar. Dennoch besteht die Möglichkeit, durch einen systemischen Gendefekt nicht nur die Zielstruktur zu verändern, sondern gleichzeitig weitere Effekte auszulösen, die unter Umständen sogar die gewünschte Modifikation der Zielstruktur überlagern. Des Weiteren ist eine genetische Veränderung nicht in jedem Fall auf alle Zellen des Organismus übertragbar und kann unter Umständen zu einem genetischen Mosaik führen. Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit Methoden zur Insertion von siRNA und shRNA in primäre murine Knochenmarkszellen etabliert, um die Zellen, die in späteren Experimenten untersucht werden sollen, zielgenau genetisch zu modifizieren.

#### **4.3.1 Einbringen von siRNA mittels Elektroporation**

Um aus primären murinen Knochenmarkszellen differenzierte DCs genetisch zu verändern, wurde als erste Methode das Einbringen von siRNA mittels Elektroporation etabliert (3.2.3). Die Auswertung der erfolgreichen Transfektion der Zellen mit siRNA erfolgte im Western Blot und mittels ELISA.



**Abb. 21 Elektroporation von DCs mit Einbringen von siRNA**

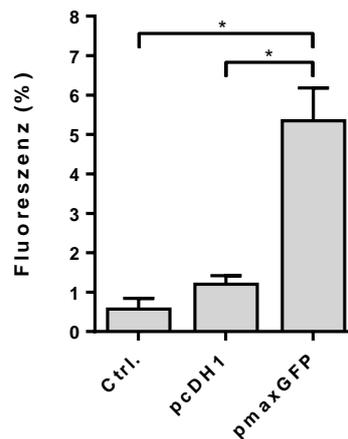
DCs wurden an Tag 4 der Ausdifferenzierung elektroporiert und siRNA gegen p47phox und IRAK4 in die Zellen eingebracht. Die Expression von p47phox (A) und IRAK4 (B) wurde nach abgeschlossener Ausdifferenzierung der DCs mittels Western Blot bestimmt, densitometrisch ausgewertet und ist als prozentuale Expression zur Kontrolle ohne Elektroporation und ohne siRNA  $\pm$ SEM dargestellt. Die Produktion von IL-12p70 wurde mittels ELISA für die mit siRNA gegen p47phox (C, E) und gegen IRAK4 (D, F) behandelten Zellen nach 20 h CpG bzw. LPS Stimulation gemessen. Die Messwerte sind normalisiert auf den Kontrollwert als Zytokinkonzentration  $\pm$ SEM dargestellt. EP=Elektroporation; n=1-4; unabhängiger t-Test; \* p<0,05; \*\* p<0,01.

Für die Behandlung mit siRNA gegen p47phox konnte keine Reduktion der Proteinexpression im Western Blot festgestellt werden. Es konnte lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten WT DCs und der Kontrolle mit isoliertem Protein aus p47phox<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet werden (Abb. 21A). Übereinstimmend damit erfolgte keine Veränderung der IL-12p70 Produktion in den mit siRNA gegen p47phox behandelten Zellen (Abb. 21C, E). Die mit siRNA gegen IRAK4 behandelten DCs zeigten eine Reduktion der IRAK4 Expression für die Kontroll-siRNA (I4wizscr) im Vergleich zur Probe ohne Elektroporation und ohne siRNA (Abb. 21B). Außerdem war eine Reduktion der IL-12p70 Produktion nach Behandlung der DCs mit einer siRNA gegen IRAK4 (I4wiz) und 20 h Stimulation mit CpG im Vergleich zur Kontrolle ohne siRNA zu beobachten (Abb. 21D).

#### **4.3.2 Transfektion von DCs mittels einer Kombination aus Lipofektion und Elektroporation**

Da durch die Elektroporation der DCs die Expression der targetierten Proteine nicht effizient reduziert werden konnte, wurde eine Kombination aus Lipofektion und Elektroporation zur Transfektion der DCs etabliert. Die DCs wurden mit den Vektoren pcDH1-cop-GFP, welcher zur Expression von shRNAs genutzt werden kann, und pmaxGFP, einem Kontrollvektor der Firma Amaxa, transfiziert (0). Die Kontrolle der Transfektion erfolgte durch die Auswertung der fluoreszierenden Zellen am Durchflusszytometer.

Mit einer Transfektionseffizienz von 1,2 % für pcDH1-cop-GFP und 5,4 % für pmaxGFP wurde diese Transfektionsmethode jedoch aufgrund zu geringer Effektivität verworfen (Abb. 22).



#### Abb. 22 Transfektion von DCs mittels Nucleofector

DCs an Tag 5 der Ausdifferenzierung wurden mit 2 µg der Vektoren pcDH1-cop-GFP und pmaxGFP bzw. als Kontrollwert (Ctrl.) ohne Vektor im Nucleofector der Firma Amaxa mit dem Programm Y-001 transfiziert. Nach zwei weiteren Tagen Kultivierung wurde die GFP-Fluoreszenz im Durchflusszytometer gemessen. Die Messwerte stellen die absolute Fluoreszenz aller lebenden Zellen prozentual  $\pm$ SEM dar. n=2, unabhängiger t-Test, \* p<0,05.

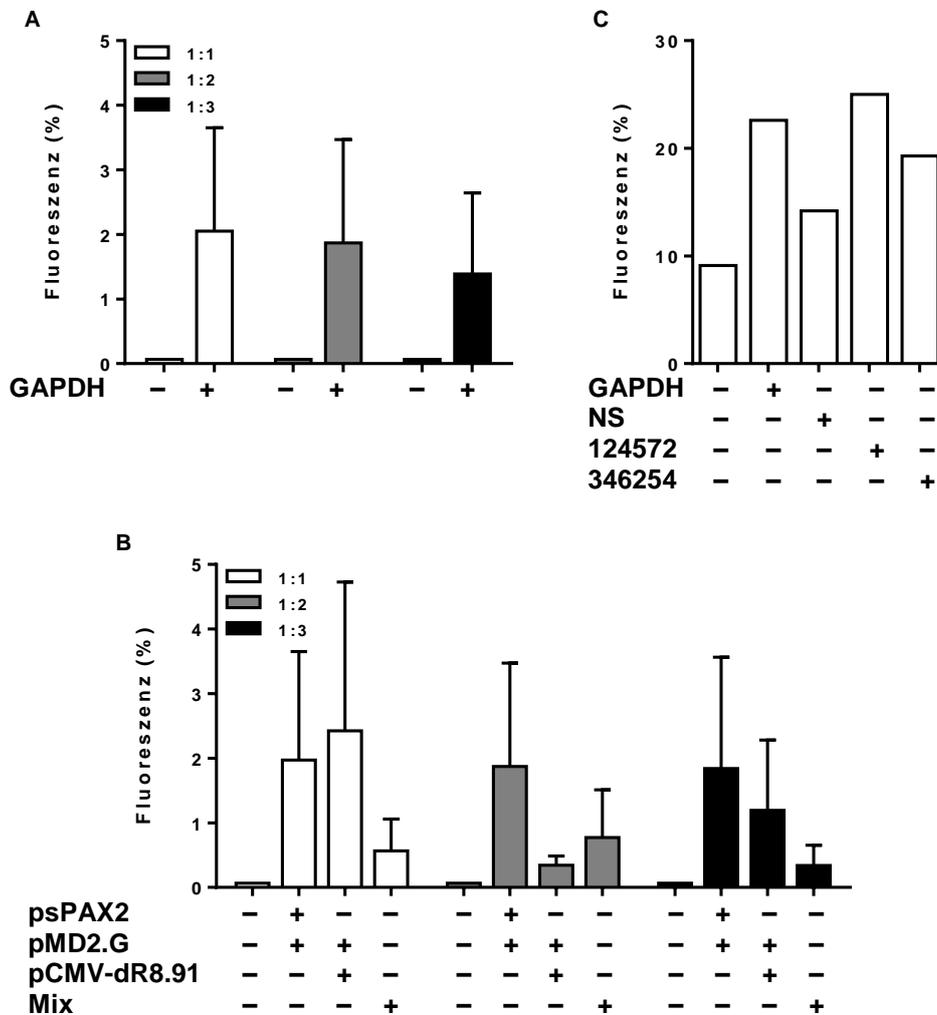
### 4.3.3 Einbringen von shRNA mit lentiviralen Vektoren

Durch das Einbringen von shRNA mit lentiviralen Vektoren ist es möglich die shRNA in das Genom der Zielzelle zu integrieren und dadurch eine dauerhafte Expression zu gewährleisten. Durch die Konstruktion eines entsprechenden Vektors mit einem Promotor unter der Kontrolle eines Antibiotikums ist es außerdem möglich, die Expression der shRNA zeitlich zu steuern. Dieser konstitutive „Knock-down“ eines Gens wurde gewählt, um eine Aktivierung der DCs durch das Einbringen von Fremd-RNA und die Folgen einer lang andauernden Expression der shRNA, welche zu einem dauerhaften Ausschalten des Zielgens führt, zu minimieren.

#### 4.3.3.1 pTRIPZ

Für die ersten Versuche wurde der konstitutive Vektor pTRIPZ verwendet (3.2.5.1). Bei dieser Methode kam es zu einer erfolgreichen Transduktion der DCs, jedoch mit sehr geringer Effizienz von maximal 2 % für ein 1:1 Verhältnis von Verpackungsmix und pTRIPZ (Abb. 23A). Aufgrund dieser Limitation wurde die Methode mit den Verpackungsvektoren psPAX, pCMV-delta8.91 und pMD2.G, sowie dem Transduktionsreagenz PEI (3.2.5.2), etabliert. Diese Methode führte erneut zu einer erfolgreichen Transduktion mit geringer Effizienz (2,5 %) für eine Transduktion mit den Verpackungsvektor pCMV-delta8.91 und Hüllvektor pMD2.G im Verhältnis 1:1 zu pTRIPZ (Abb. 23B). Für weitere Versuche wurde das Verpackungsplasmid pCMV-

delta8.91 und der Hüllvektor pMD2.G, sowie die HBS-Methode für die Transfektion von pTRIPZ (3.2.5.3) gewählt. Die durchflusszytometrische Auswertung zur Kontrolle der Fluoreszenz in den transduzierten Zellen zeigte eine erhöhte Transduktionseffizienz im Vergleich zu den vorangegangenen Methoden von bis zu 25 % (Abb. 23C).



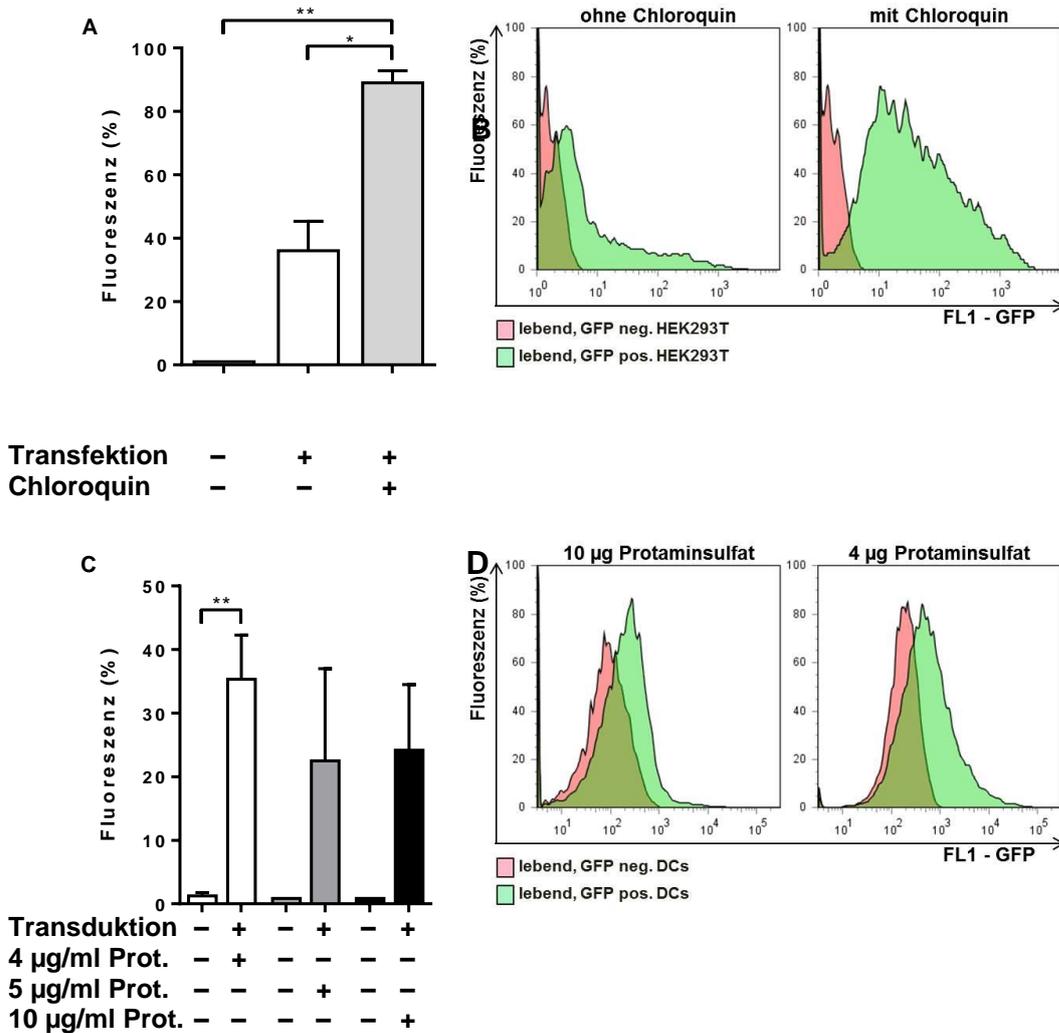
**Abb. 23 Transduktion von DCs mit pTRIPZ**

DCs an Tag 5 der Ausdifferenzierung wurden mit Viruspartikeln transduziert, welche (A) aus dem Vektor pTRIPZ-GAPDH und dem Transfektionsreagenz ArrestIn mittels Transfektion nach OpenBiosystem, (B) aus den Vektoren pTRIPZ-GAPDH, psPAX2, pMD2.G, pCMV-dR8.91 oder dem Verpackungsmix von OpenBiosystem mittel Transfektion mit PEI und (C) mit den Vektoren pTRIPZ-GAPDH, -NS, -Ncf1 124572, Ncf1 346254, pMD2.G und pCMV-dR8.91 mittels Transfektion mit HBS hergestellt wurden. Dargestellt sind die prozentualen durchflusszytometrischen Messwerte der absoluten tRFP-Fluoreszenz aller lebenden Zellen  $\pm$ SEM. n=1-3. Die Legende bezieht sich auf das Verhältnis von Verpackungsmix zum Targetingvektor.

#### 4.3.3.2 pcDH1

Da die mit der HBS-Methode erzeugten Viruspartikel in den vorangegangenen Versuchen die höchste Transduktionseffizienz aufwiesen, wurde diese Methode der Transfektion für weitere Versuche beibehalten. Für diese Methode wurde der Vektor pTRIPZ gegen den Vektor pcDH1-cop-GFP ausgetauscht (3.2.5.3), da mit diesem Vektor bereits erfolgreiche Ergebnisse mit einer Transduktionseffizienz von über 90 % gezeigt werden konnten [74]. Wie nach der durchflusszytometrischen Auswertung zu erkennen, war die Transfektionseffizienz der Produktionszellen HEK293T unter Zusatz von Chloroquin bei 90 % (Abb. 24A, B). Die Transduktion der DCs erfolgte zu 40%, wobei die Anwendung von 4 µg/ml Protaminsulfat zur höchsten Transduktionseffizienz (35 %) führte (Abb. 24C, D).

Der Vektor pcDH1-cop-GFP sollte durch das Einsetzen einer shRNA-Kassette aus dem Vektor pTRIPZ ebenfalls zu einem konstitutiven shRNA-Vektor kloniert werden. Aufgrund zeitlicher Restriktionen konnte diese erfolgreich etablierte Methode jedoch nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit für die Transduktion eingesetzt werden.



### Abb. 24 Transfektion und Transduktion mit pcDH1-copGFP

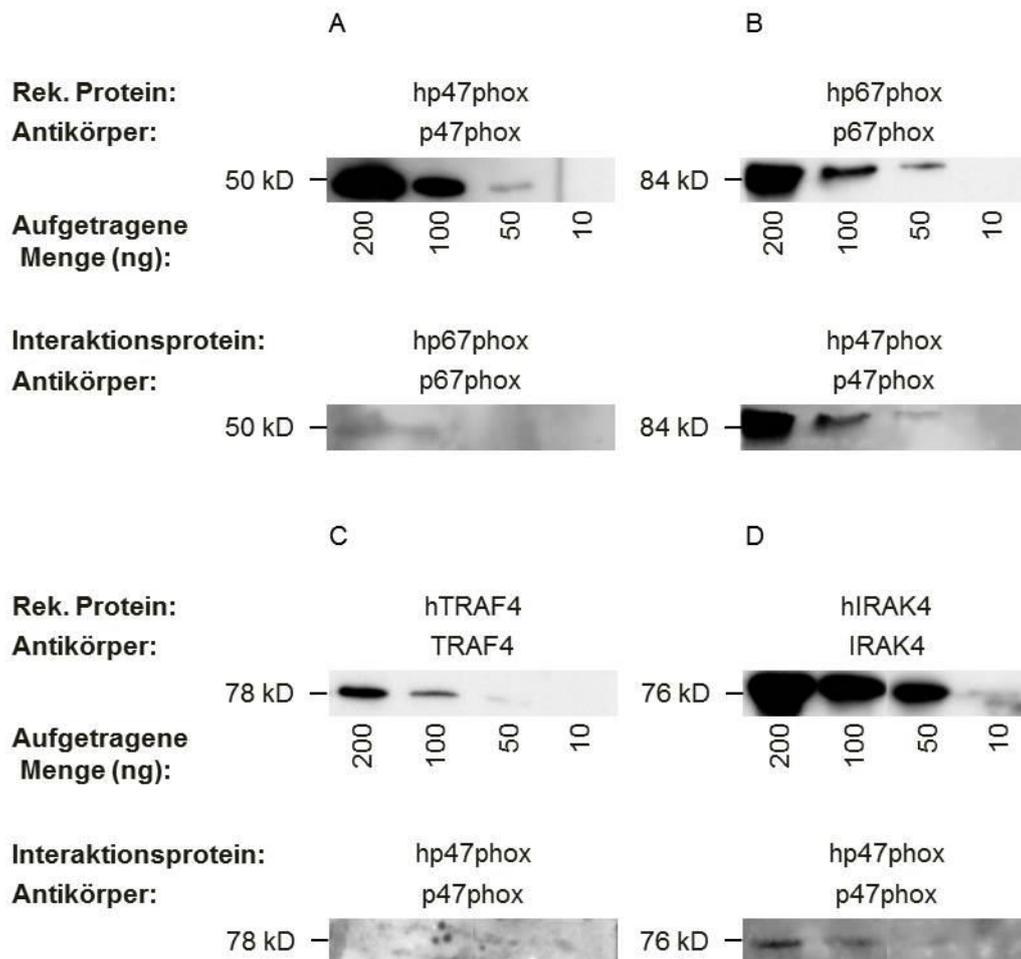
HEK293T Zellen wurden mit den Vektoren pcDH1-copGFP, pMD2.G und pCMV-dR8.91 mittels HBS ± 25 µM Chloroquin transfiziert (A, B). Die hergestellten Viruspartikel wurden zur Transduktion von DCs an Tag 5 der Ausdifferenzierung unter Zugabe von 4-10 µg/ml Protaminsulfat für die Transduktion verwendet (B, D). Dargestellt sind die prozentualen durchflusszytometrischen Messwerte der absoluten GFP-Fluoreszenz aller lebenden Zellen ±SEM (A, C) bzw. die Anzahl (log) und prozentuale GFP-Fluoreszenz aller lebenden Zellen gemessen im Durchflusszytometer (B, D). n=2-3, unabhängiger t-Test, \* p<0,05, \*\* p<0,01.

#### **4.4 Untersuchung der molekularen Angriffsorte von p47phox und IRAK4 innerhalb der TLR-Signalkaskade und weiterer Interaktionspartner**

Es wurde nachgewiesen, dass p47phox und IRAK4 an der Produktion von IL-12p70 innerhalb der TLR-Signalkaskade beteiligt sind [1,47]. Bisher wurden in der Literatur sowohl andere Mitglieder der IRAK-Familie als Interaktionspartner für IRAK4, als auch TRAF4 als Interaktionspartner für p47phox untersucht [44,45]. Ein vollständiges Verständnis der Abläufe dieser Interaktionen liegt jedoch nicht vor und es gibt keine Indikation, wie die IL-12p70 Produktion im Detail beeinflusst wird. Um diese Wechselwirkungen näher zu untersuchen wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Methoden zur Ermittlung der Interaktionspartner von IRAK4 und p47phox in den TLR-Signalwegen etabliert.

##### **4.4.1 Untersuchungen von Interaktionspartnern im Far-Western Blot**

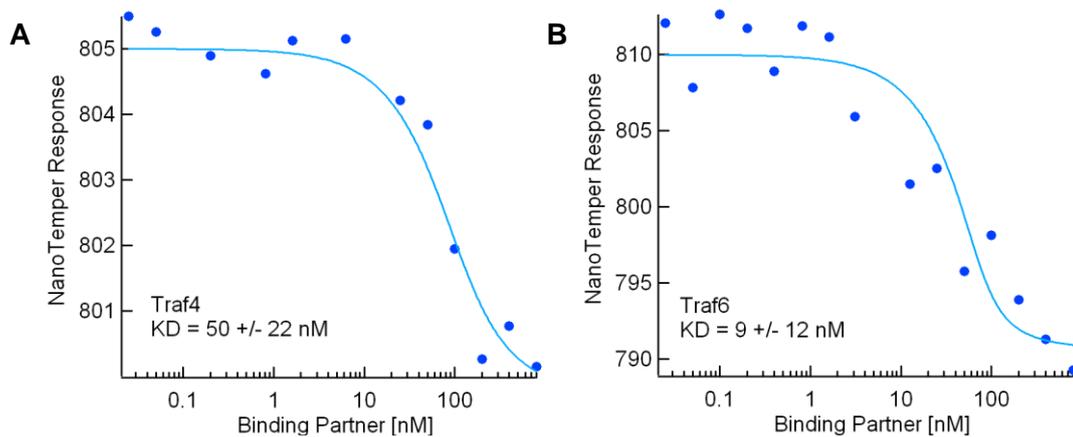
In ersten Versuchen wurde die Ko-Immunopräzipitation für die Suche nach bekannten und unbekanntem Interaktionspartnern von p47phox benutzt. Aufgrund des Mangels an adäquaten Antikörpern für die Präzipitation wurde die Methode des Far-Western Blot im Zuge dieser Arbeit etabliert. Hierfür wurden rekombinante humane Proteine (p47phox, p67phox, TRAF4 und IRAK4) in unterschiedlichen Mengen mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, geblottet und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen (Abb. 25A-D obere Abbildung). Im Anschluss wurde die respektive Membran mit rekombinantem, humanem p47phox inkubiert. Nach dem Waschen der Membranen wurde das p47phox, welches mit dem auf der Membran gebundenen Protein interagiert, mittels Antikörper nachgewiesen. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die beiden Untereinheiten p47phox und p67phox der NADPH-Oxidase wie erwartet miteinander interagieren (Abb. 25A, B). Eine Interaktion zwischen TRAF4 und p47phox konnte mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden, jedoch erfolgte eine Interaktion zwischen IRAK4 und p47phox (Abb. 25D).



**Abb. 25 Interaktion von p67phox, TRAF4 und IRAK4 mit p47phox im Far-Western Blot**  
 Rekombinante, humane Proteine (hp47phox, hp67phox, hTRAF4 und hIRAK4) wurden auf ein PAA-Gel aufgetragen, separiert und im Anschluss auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Proteine wurden mit den entsprechenden Antikörpern (jeweiliges oberes Bild) zunächst nachgewiesen. Anschließend wurden Primär- und Sekundäntikörper entfernt und die Membranen mit rekombinantem, humanen p47phox inkubiert. Die Interaktion von p47phox wurde dann durch einen p47phox-Antikörper nachgewiesen.

#### 4.4.2 Untersuchungen von Interaktionspartnern mittels Microscale Thermophoresis

Die Methode des Far-Western Blot konnte erfolgreich für rekombinante Proteine etabliert werden, führte jedoch mit der geringen Menge an endogenem Protein in den DCs nicht zum Erfolg. Daher wurde die Methode der „Microscale Thermophoresis“ für die Identifikation von Interaktionspartnern für p47phox und IRAK4 etabliert, welche mit geringeren Proteinmengen durchgeführt werden kann. In ersten Versuchen wurde aus primären murinen WT Knochenmarkszellen isoliertes p47phox und TRAF4 bzw. TRAF6 für die Interaktionsuntersuchung verwendet. Die Messung zeigte, dass es zu einer starken Interaktion zwischen TRAF4 und p47phox kommt und einer im Verhältnis noch stärkeren Affinität zwischen TRAF6 und p47phox (Abb. 26A, B).



**Abb. 26 Interaktion von TRAF4 und TRAF6 mit p47phox**

Fluoreszenzmarkiertes p47phox wurde mit variierenden Konzentrationen von TRAF4 bzw. TRAF6 (0-170 nM) inkubiert und thermophoretisch gemessen. Dargestellt ist die Änderung der Fluoreszenz unter dem Einfluss der Bindung der Interaktionspartner zur Konzentration von TRAF4 bzw. TRAF6. n=1.

## 5 DISKUSSION

Dendritische Zellen spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem. Es handelt sich bei DCs um die Hauptproduzenten von IL-12p70 und IL-23 [75] und sie besitzen die Fähigkeit B- und T-Zellen Antigene zu präsentieren. DCs sind als einzige Zellen in der Lage, die T-Zellantwort zu initiieren [4], und durch ihre Ausschüttung von IL-12p70 und/oder IL-23 bestimmen sie außerdem die Polarisation dieser T-Zellantwort [8]. Bei vermehrter Ausschüttung von IL-23 verschiebt sich diese zur  $T_{H17}$ -Antwort, welche protumorigen und proinflammatorisch wirkt [76]. IL-23 wie auch IL-12 spielen eine bedeutende Rolle bei Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose (MS), Psoriasis oder entzündlichen Darmerkrankungen (IBD) [77–79]. Ähnlich zu IL-23 führt eine vermehrte Ausschüttung von IL-12p70 ebenfalls zu einer proinflammatorischen Ausrichtung, jedoch führt die durch IL-12p70 induzierte  $T_{H1}$ -Antwort zusätzlich zur vermehrten anti-Tumor Aktivität [80].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von IRAK4 in der TLR-Signalkaskade untersucht, welche zur Produktion von IL-12p70 in DCs führt. Da dieses proinflammatorische Zytokin mit unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen assoziiert wird, aber auch einen antitumorigenen Effekt besitzt, könnte eine Regulation durch IRAK4 einen vielversprechenden Ansatz zum Verständnis der Regulation von IL-12p70 in DCs darstellen.

### 5.1 Untersuchungen zur Modulation von IL-12p70 durch IRAK4

Zur Untersuchung der Modulation von IL-12p70 durch IRAK4 wurden murine primäre Knochenmarkszellen verwendet, welche mit GM-CSF zu DCs differenziert wurden. Die Stimulation dieser DCs mit CpG zeigte einen Anstieg von IL-12p70, welcher bei einer Stimulation mit LPS nicht zu beobachten ist (Abb. 10; Abb. 11). Bisherige Untersuchungen zeigten, dass ein Mangel an IRAK4 für die Weitergabe des Signals in der TLR-Signalkette schwere Folgen hat. Nach Stimulation mit LPS zeigen sich IRAK4<sup>-/-</sup> Mäuse resistent gegen septischen Schock und die gemessene IL-6- sowie TNF-Konzentration im Serum ist stark reduziert im Vergleich zu WT Mäusen [47]. Diese Beobachtungen konnten sowohl in B-Zellen, als auch in aus dem Knochenmark isolierten Makrophagen wiederholt werden. Die wichtige Rolle von IRAK4 in der Signalweitergabe konnte ebenfalls in Patienten mit einer Mutation im IRAK4-Gen

festgestellt werden [81], sowie durch eine Mutation in MyD88, welches zu einer Störung der Rekrutierung von IRAK4 im TLR-Signalweg führte [82]. Obwohl auch eine Injektion von CpG bei IRAK4<sup>-/-</sup> Mäusen zu einem Abfall von IL-6 im Serum führte [47], konnten bisher noch keine Ergebnisse zur Wirkung von CpG auf die IL-12p70 Sekretion von DCs aus IRAK4<sup>-/-</sup> Mäusen gezeigt werden. Somit ist der in dieser Arbeit gezeigte Befund im Gesamtbild der bisherigen Ergebnisse zwar unerwartet, stellt aber mit den Ergebnissen von Kubo-Murai und Kollegen, welche ebenfalls zeigen, dass IRAK4 ein negatives Feedback auf den TLR-Signalweg ausüben kann [48], einen neuen Baustein im Verständnis der TLR-Signalwege dar.

Um zu klären, ob die Expression der beiden Untereinheiten von IL-12p70 an der Regulation nach CpG Stimulation beteiligt sind, wurde die mRNA Expression von IL-12p35 und p40 gemessen. Hierbei zeigte sich eine geringfügige Erhöhung der IL-12p35 Expression nach CpG Stimulation (Abb. 12A). Da es sich bei IL-12p35 um die limitierende Untereinheit von IL-12p70 handelt [83], kann die vermehrte Expression zum oben genannten Anstieg von IL-12p70 nach CpG-Stimulation führen. Der gemessene IL-12p40 Gehalt ist nach CpG-Stimulation leicht erniedrigt (Abb. 12B) bzw. nach LPS-Stimulation leicht erhöht (Abb. 12D). Da IL-12p40 jedoch im Überschuss vorhanden ist, sollten diese geringfügigen Schwankungen die Expression von IL-12p70 nicht beeinflussen.

Die Untersuchung von zusätzlichen Zytokinen resultierte in vergleichbaren Ergebnissen zu denen der IL-12p70 Sekretion. Die mit CpG stimulierten DCs der IRAK4<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten sowohl für IL-1 $\beta$ , als auch für IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  eine erhöhte Sekretion im Vergleich zum WT, welche jedoch nur für IL-6 und IL-10 signifikant ist (Abb. 13). Bei Stimulation mit LPS ergaben sich eine reduzierte Sekretion von IL-1 $\beta$ , jedoch eine signifikant erhöhte Sekretion von IL-10 und ein gleichbleibendes Level an TNF- $\alpha$  im Vergleich zum WT (Abb. 14). Da es sich hier um grundlegend unterschiedliche Zytokine handelt, die jedoch durch Signalwege gebildet werden, welche gleiche Signalkomponenten nutzen, ist die Interpretation dieser Ergebnisse sehr komplex. Da sowohl die IL-12p70, als auch die IL-6 und IL-10 Produktion in IRAK4<sup>-/-</sup> Mäusen nach CpG Stimulation signifikant erhöht ist, bedarf es weiterer Experimente, um den Zusammenhang innerhalb der Signalkaskaden zu ergründen. Denkbar wäre ein Einfluss des negativen Feedbacks von IRAK4 auf die Aktivierung von verschiedenen

Transkriptionsfaktoren, welcher in den Knock-out Mäusen zur erhöhten Zytokinproduktion führen könnte.

Die als endogene Amplifikatoren beschriebenen Alarmine aus der IL-1 Familie, IL-1 und IL-33, nutzen z.B. den vom Adaptorprotein MyD88-abhängigen Signalweg ähnlich wie TLR-Liganden für die Induktion der Transkriptionsfaktoren. Daher wurde in folgenden Versuchen untersucht, ob die Vorstimulation von DCs mit IL-1 $\beta$  bzw. IL-33 einen Einfluss auf die Bildung von IL-12p70 hat. Hierbei konnte erneut gezeigt werden, dass CpG zu einer erhöhten IL-12p70 Produktion in DCs aus IRAK4<sup>-/-</sup> Mäusen führt, welches nach Stimulation mit LPS nicht erfolgt. Des Weiteren war zu beobachten, dass die Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  sowohl nach CpG, als auch nach LPS Stimulation bei den DCs aus IRAK4<sup>-/-</sup> Mäusen zu einer erhöhten Produktion von IL-12p70 führt im Vergleich zur alleinigen Gabe des jeweiligen Stimulus (Abb. 18). Dies lässt den Rückschluss zu, dass eine Vorstimulation von zwei Stunden nicht ausreicht, um die gemeinsamen Komponenten der Signalwege von IL-1 $\beta$  und IL-12p70 zu depletieren und so zu einem Rückgang der IL-12p70 Produktion zu führen. Vielmehr scheint die Gabe von IL-1 $\beta$  zur Induktion der IL-12p70 Produktion zu führen. Außerdem wird der Unterschied in der IL-12p70 Produkten zwischen den Zellen der WT und IRAK4<sup>-/-</sup> Mäuse durch die Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  vergrößert, so dass auch bei LPS Stimulation der DCs aus IRAK4<sup>-/-</sup> Mäusen eine signifikant höhere Produktion von IL-12p70 zu messen war. Die Vorstimulation mit IL-33 führte bei CpG Stimulation zu entgegengesetzten Ergebnissen im Vergleich zur IL-1 $\beta$  Stimulation. In diesem Fall war ein Rückgang der IL-12p70 Produktion sowohl bei den WT, als auch bei den IRAK4<sup>-/-</sup> Zellen zu beobachten, wobei der Unterschied in der Produktion des Zytokins zwischen den Zelllinien erhalten blieb. Für die Stimulation mit LPS zeigte sich ein deutlicher Anstieg der IL-12p70 Sekretion und ebenso ein deutlich stärkerer Unterschied zwischen den Zelllinien, wobei die IRAK4<sup>-/-</sup> Zellen eine signifikant höhere IL-12p70 Produktion aufwiesen. Zusammenfassend zeigen diese Kostimulationsversuche, dass kein synergistischer Effekt durch die Gabe von IL-1 $\beta$  bzw. IL-33 vor der Stimulation mit CpG oder LPS ansteuerbar ist. Diese Versuche bestätigen jedoch klar, dass ein negatives Feedback von IRAK4 nicht nur auf den TLR9-Signalweg wirkt, sondern auch auf die Signaltransduktion von IL-1 $\beta$  und IL-33. Damit konnte gezeigt werden, dass alle TLR/TIR enthaltenen Signalwege von diesem negativen Feedback betroffen sind. Zusätzlich könnten diese Ergebnisse zur Aufklärung

der Wirkweise des negativen Feedbacks von p47phox im TLR9 Signalweg bei der Produktion von IL-12p70 beitragen. Hierbei wurde durch unsere Arbeitsgruppe festgestellt, dass p47phox<sup>-/-</sup> Mäuse nach CpG Stimulation mehr IL-12p70 produzieren als WT Mäuse [1]. Dieses Feedback ist unabhängig von der ROS-Produktion der Zellen, jedoch konnten bisher keine weiteren Angaben zum Zusammenspiel der TLR-Signalkomponenten gemacht werden, welches zu diesem Feedbackmechanismus führt. Auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit kann man annehmen, dass die fehlende Phosphorylierung von p47phox durch IRAK4 (2.5.3) die Ursache dieses Feedbacks darstellt.

Da es sich bei IRAK4 um ein Protein der IRAK-Familie handelt, deren Proteine miteinander in der TLR-Signalwegen interagieren [45], könnte eine Kompensation anderer Proteine aus dieser Familie zu den oben beschriebenen Ergebnissen beitragen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die mRNA- Expression der IRAK-Proteine nach Stimulation mit CpG bzw. LPS in den DCs der WT und IRAK4<sup>-/-</sup> Mäuse gemessen. Hierbei zeigten sich für IRAK1, IRAK2 und IRAK3 (IRAKM) keine deutlichen Unterschiede zwischen den Mauslinien für die CpG Stimulation (Abb. 15). Lediglich nach LPS Stimulation war ein geringer Anstieg der Expression von IRAK3 in den Zellen der WT Mäuse zu beobachten (Abb. 16). Da IRAK3 die Assoziation von IRAK1 und IRAK4 mit MyD88 verhindert und somit die Weiterleitung des Signals im TLR-Signalweg blockiert [61], könnte eine erhöhte Expression von IRAK3 in WT DCs nach LPS Stimulation eine Ursache der geringeren Zytokinsekretion sein, die unter anderem von Suzuki et al. gezeigt werden konnte. Im Hinblick auf die in dieser Arbeit untersuchte Sekretion von IL-12p70 lassen sich jedoch durch die Messung der mRNA-Expression der IRAK-Proteine keine Rückschlüsse ziehen. Da trotz der hohen Anzahl von Versuchstieren keine signifikanten Unterschiede zu beobachten waren, scheinen die Proteine der IRAK-Familie im Rahmen dieses Versuchsaufbaus nicht zu einer Kompensation von IRAK4 zu führen bzw. werden durch den Wegfall von IRAK4 nicht in ihrer Funktion gehemmt.

Wie im vorangegangenen erläutert, wurde mehrfach eine Toleranz gegenüber LPS in IRAK4<sup>-/-</sup> Mäusen aber auch in Patienten mit Mutationen in IRAK4 an Hand der Reduktion der Sekretion von IL-6 oder TNF- $\alpha$  gezeigt. Da bei den Versuchen in dieser Arbeit jedoch IL-12p70 nachgewiesen wurde und dieses in IRAK4<sup>-/-</sup> DCs nicht signifikant erniedrigt war, wurde die Reaktion der IRAK4<sup>-/-</sup> DCs gegenüber reinem

LPS überprüft. Für die vorangegangenen Versuche wurde LPS von *E.coli* verwendet, welches zusätzlich zum reinen LPS andere Bestandteile der Bakterienzellwand enthalten kann. Dies kann zu einer Aktivierung des TLR2 führen [84], welches zu einer Verfälschung der gemessenen IL-12p70 Konzentration führen würde. Mit der Verwendung von reinem LPS konnte gezeigt werden, dass die IL-12p70 Konzentration signifikant niedriger liegt als nach der Stimulation mit „unreinem“ LPS (Abb. 17). Jedoch ist weiterhin kein Unterschied in der IL-12p70 Konzentration zwischen den WT und IRAK4<sup>-/-</sup> DCs zu beobachten. Somit kann eine Beeinflussung der Messung von IL-12p70 durch TLR2 ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der anfänglich gemessene Anstieg von IL-12p70 in IRAK4<sup>-/-</sup> DCs nach CpG Stimulation nicht auf eine unterschiedliche Regulation der Untereinheiten von IL-12p70 zurückzuführen ist. Auch die Beteiligung der anderen IRAK-Proteine scheint nicht die Ursache für diesen Befund zu sein. Ein Anstieg der weiteren gemessenen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  weist darauf hin, dass es sich um ein Zusammenspiel der verschiedenen, an der Expression dieser Zytokine beteiligten Signalwege handelt, welches genauer untersucht werden muss. Ein weiterer Hinweis hierfür sind die Ergebnisse der Versuche zur Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  und IL-33. Jedoch ist durch das komplexe Zusammenspiel der Signalwege eine genaue Aussage durch die alleinige Messung von Zytokinkonzentrationen nicht möglich, da zu viele Komponenten zur Regulation der Zytokine beitragen, so dass eine Isolation des „IRAK4-Effektes“ kaum möglich ist. Eine Lösung dieses Problems könnten sh- und siRNA-Versuche darstellen (5.3), welche es ermöglichen, durch die sukzessive Stilllegung bestimmter Komponenten des Signalweges, die Komplexität besser aufzulösen. Hierzu wird das Wissen aus den Versuchen zur Auffindung der Interaktionspartner von IRAK4 im TLR-Signalweg zur IL-12p70 Produktion benötigt (5.4). Ein weiteres Hindernis in der Untersuchung zur Modulation von IL-12p70 durch IRAK4 stellt die Verwendung von DCs dar. Da es sich bei DCs nicht um eine Zelllinie handelt, ist für jeden Versuch eine erneute Isolation und Ausdifferenzierung der Zellen nötig. Dies und die jeweilige Verwendung von neuen Mäusen sind Faktoren, die zu einer erhöhten Variabilität führen, welche sich in der hohen Standardabweichung innerhalb der Versuche niederschlägt. Da es nicht möglich ist, die Zellen auf einen gemeinsamen Ausgangszustand vor Beginn der Versuche zu bringen, könnte dies zu einer Maskierung der eigentlichen Ergebnisse geführt haben. Eine Wiederholung der

Versuche mit einer immortalisierten DC Ziellinie könnte sich für die Zukunft hilfreich erweisen, um diese Abweichungen zu verhindern.

## 5.2 Charakterisierung von DCs, welche für die p47phox- bzw. IRAK4-abhängige Modulation von IL-12p70 verantwortlich sind

Dendritische Zellen spielen ohne Frage eine zentrale Rolle in der Immunabwehr, dennoch stellt die Unterteilung in verschiedene Subgruppen immer noch ein Problem dar. Zurzeit ist die Ansicht am weitesten verbreitet, dass es fünf unterschiedliche Subgruppen von DCs gibt [85]. Es wird vermutet, dass nicht so sehr die Subgruppe, sondern der Kontakt zu einer bestimmten stimulierenden Substanz die Art der Zytokinproduktion durch DCs bestimmt [86]. Dennoch scheinen verschiedene Subgruppen von DCs durch ein und denselben Stimulus unterschiedliche Zytokinantworten zu produzieren [87]. Die Bestimmung der DC Subgruppen kann durch die Ontogenese, den Phänotyp, die Funktion oder bestimmte Zelloberflächenmarker erfolgen. Zurzeit gibt es keine einheitliche Klassifizierung von DC Subgruppen, welche der Vielfältigkeit dieser Effektorzellen gerecht wird [88]. Durch die Durchflusszytometrie wurde die Verwendung von verschiedenen Zellmarkern zur Bestimmung unterschiedlicher Zellsubgruppen als primäres Bestimmungsmerkmal vereinfacht. So wurde gezeigt, dass die negative Rückkopplung von p47phox auf die IL-12p70 Produktion nach Stimulation durch CpG hauptsächlich in CD11c-positiven DCs stattfindet [1]. Da im Rahmen dieser Arbeit eine ähnliche Rückkopplung von IRAK4 auf die IL-12p70 Produktion gezeigt werden konnte, wurde überprüft, ob der Gehalt an CD11c-positiven DCs in WT, IRAK4<sup>-/-</sup> und p47phox<sup>-/-</sup> Mäusen identisch ist und ob die Stimulation mit CpG einen Einfluss auf die Anzahl an CD11c-positiven DCs hat. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es keinen Unterschied in der Anzahl CD11c-positiver DCs zwischen den Mauslinien und nach CpG-Stimulation gibt (Abb. 19A). Im Zuge dessen kann ausgeschlossen werden, dass eine größere Subgruppe von CD11c-positiven DCs für die erhöhte IL-12p70 Produktion in IRAK4<sup>-/-</sup> DCs verantwortlich ist. Die Verwendung von CD11c als Marker für die Identifizierung von DCs ist jedoch umstritten, da gezeigt werden konnte, dass CD11c auch auf anderen Zellen exprimiert wird [17,18]. Daher erfolgte eine genauere Auftrennung der Zellsubpopulationen der verschiedenen Mauslinien mit den Zelloberflächenmarkern CD8 $\alpha$ , CD3, CD11c und XCR1. Zuerst wurden die CD8 $\alpha$ -positiven Zellen aus dem Zellgemisch selektiert (Abb. 19B), welches dem Subtyp der CD8 $\alpha$ -positiven cDCs im lymphatischen Gewebe und der CD103-positiven, CD11b-negativen cDCs im nicht-lymphatischen Gewebe entspricht [89–91]. Diese Subpopulation ist besonders effizient in der Aktivierung von CD8 $\alpha$ -positiven T-Zellen unter anderem durch ihre IL-12p70 Produktion [85,91]. Um

eine eventuelle Kontamination dieser Population mit CD8 $\alpha$ -positiven T-Zellen auszuschließen, wurde die CD8 $\alpha$ -positive, CD3-negative Subpopulation für die weiteren Analysen verwendet. Diese Subpopulation in der jeweiligen Mauslinie wurde auf den Gehalt an CD11c und XCR1 überprüft, sowohl mit als auch ohne CpG-Stimulation. Bei XCR1 handelt es sich um den Rezeptor der Chemokine XCL1 (ATAC, Lymphotactin oder SCM-1), der spezifisch in CD8 $\alpha$ -positiven DCs der Leber und anderen lymphatischen Organen der Maus exprimiert wird [92]. Hierbei konnte kein Unterschied in der Größe der Subpopulationen zwischen den aus dem Knochenmark der WT, IRAK4<sup>-/-</sup> und p47phox<sup>-/-</sup> Mäuse isolierten Zellen festgestellt werden (Abb. 19C). Lediglich die p47phox<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen eine 30 % Reduktion der CD8 $\alpha$ -positiven, CD3-negativen, CD11c-positiven und XCR1-negativen Zellpopulation im Vergleich zum WT auf, welche jedoch unter CpG-Stimulation nicht vorhanden ist. Zusammenfassend ist also festzustellen, dass die Subpopulationen, welche durch den Marker XCR1 definitiv nach jetzigem Stand der Forschung als DCs identifiziert wurden, in den unterschiedlichen Mauslinien nicht variieren und somit mit großer Wahrscheinlichkeit nicht die Ursache der veränderten IL-12p70 Produktion in den IRAK4<sup>-/-</sup> bzw. p47phox<sup>-/-</sup> Mäusen darstellen.

Eine weitere Möglichkeit der Unterscheidung von DCs von anderen mononuklearen Phagozyten ist die Betrachtung von Transkriptionsfaktoren. Es wurde gezeigt, dass verschiedene Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle in der Entwicklung von DCs spielen [93], jedoch ist keiner dieser Faktoren geeignet, um eine bestimmte Subpopulation zu identifizieren. Mäusen mit einem Mangel an Transkriptionsfaktor IRF8 fehlten zum Beispiel pDCs, wie auch CD8 $\alpha$ -positive cDCs und andere Zellarten des Immunsystems [94,95] und der Transkriptionsfaktor Batf3, welcher für die Entwicklung der CD8 $\alpha$ -positiven cDCs benötigt wird, wird ebenfalls in anderen myeloiden Zellen [96] und Th1-Zellen [97] exprimiert. Jedoch gelang es M. Meredith/A. Satpathy und Kollegen einen Transkriptionsfaktor zu finden, welcher spezifisch für DCs ist. Hierbei handelt es sich um den Zinkfinger Transkriptionsfaktor Zbtb46, welcher nicht für die Entwicklung von cDCs benötigt wird und spezifisch von cDC, aber nicht von Monozyten oder andern Zellpopulationen des Immunsystems exprimiert wird [19,20]. Da eine Unterscheidung der DC Subpopulationen durch Oberflächenmarker keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Mauslinien dieser Arbeit zeigen konnte, welche zu einem Unterschied in der durch TLR9-Stimulation

induzierten IL-12p70 führen könnte, wurde eine weitere Überprüfung der primären Knochenmarkszellen mit dem Transkriptionsfaktors Zbtb46 als Marker für cDCs durchgeführt. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von Zbtb46 zwischen den Mauslinien festgestellt werden (Abb. 20). Lediglich eine leichte Erhöhung in der Expression von Zbtb46 bei IRAK4<sup>-/-</sup> Zellen könnte auf einen erhöhten Gehalt an cDCs hindeuten, welches zu einer vermehrten IL-12p70 Produktion bei IRAK4<sup>-/-</sup> Mäusen deuten könnte. Jedoch konnte auf Grund der hohen Standardabweichung auch bei vielfacher Wiederholung kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die bisherigen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine weitere Überprüfung der Subpopulationen der primären Knochenmarkszellen durchgeführt werden sollte, um die Population zu finden, welche den Unterschied in der TLR9-induzierten IL12p70 Produktion ausmacht. Die TLR9-Stimulation dieser Subpopulation könnte dann einen weitaus stärkeren Unterschied in der IL-12p70 Produktion zwischen den Mauslinien zeigen, als das Gemisch der verschiedenen DCs. Zur Identifikation dieser Subpopulation sollten sowohl Oberflächenmarker mittels FACS-Sorting als auch die Expression von Transkriptionsfaktoren mittels qRT-PCR verwendet werden.

### **5.3 Etablierung von Methoden zum Einbringen von shRNA und siRNA in DCs zur Modulation der p47phox- und IRAK4-Expression**

Aufgrund ihrer Funktion im Immunsystem stellt das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in DCs ein Problem dar. Die Nukleinsäuren werden von DCs aufgenommen, zerstört und als Antigen präsentiert. Die gewünschte Wirkung, eine Überexpression eines bestimmten Gens oder dessen Stilllegung, kann somit nicht gewährleistet werden. Außerdem führt schon der alleinige Kontakt mit den Nukleinsäuren zu einer Aktivierung der DCs, so dass die Messung einer Änderung der Zytokinausschüttung als Folge einer erfolgreichen Transfektion nicht möglich ist. Natürlich stellen genetisch manipulierte Mäuse eine etablierte und anerkannte Methode zur Untersuchung von Gendefekten dar und sind eine Quelle zur Gewinnung von genetisch manipulierten, aus dem Knochenmark isolierten DCs. Jedoch kann durch die Manipulation von Genen in der Keimbahn nicht mit Sicherheit ein systemisches Ausschalten dieser Gene gewährleistet werden. So können die aus dem Knochenmark isolierten Zellen ein Gemisch aus veränderten und unveränderten Zellen darstellen, welches wiederum zu einer veränderten Zytokinausschüttung führen kann. Daher war ein Gegenstand dieser Arbeit die Etablierung einer Methode zum Einbringen von shRNA oder siRNA in DCs, welche einerseits eine hohe Transfektionseffizienz aufweist, andererseits jedoch nicht zur Aktivierung der DCs führt.

Als erste Methode wurde die Elektroporation getestet. Hierbei handelt es sich um eine weitverbreitete, etablierte Methode zum Einbringen von kleinen Molekülen oder DNA in Zellen [98]. Durch das Anwenden kurzer elektrischer Impulse erfolgt eine transiente Permeabilisierung der Zellmembran, wodurch das hydrophile DNA-Molekül nach Interaktion mit der destabilisierten Membran in die Zelle gelangen kann [99]. Im Anschluss muss die DNA in den Zellkern gelangen und dort exprimiert werden. Durch das Einbringen von siRNA mittels Elektroporation konnte eine leichte Reduktion der Expression des Zielgens in den elektroporierten Zellen festgestellt werden (Abb. 21A/B). Dieser Rückgang ist jedoch nicht signifikant, variiert stark in den unterschiedlichen Versuchsansätzen und ist weniger effizient als das systemische Ausschalten des Gens in genetisch veränderten Mäusen. Der Einfluss der Elektroporation und das Einbringen der RNA auf die Zytokinproduktion wurde nach siebentägiger Ausdifferenzierung der DCs und 20 h CpG bzw. LPS Stimulation

gemessen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Zytokinausschüttung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (keine Elektroporation und kein Kontakt zur siRNA) stark variiert (Abb. 21C-F). Diese Variationen korrelieren nicht mit der geringeren Expression des Zielgens. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Elektroporation von DCs und das Einführen der siRNA zu keinem verlässlich reproduzierbaren Ergebnis führt, bei dem die Expression des Zielgens annähernd verhindert wird. Die widersprüchlichen Ergebnisse zur IL-12p70 Produktion nach Einbringen der siRNA können aufgrund eines Zellgemisches aus transfizierten und nicht-transfizierten Zellen zurückzuführen sein, wobei jede Versuchswiederholung ein anderes Verhältnis dieser beiden Populationen aufweist.

Da die Methode der Elektroporation aufgrund ihrer geringen Transfektionseffizienz, gemessen an der Expression des Zielgens, nicht für weitere Versuche geeignet war, wurde eine Kombination aus Elektroporation und Lipofektion evaluiert. Der Zusatznutzen dieser Kombination stellt das Komplexieren der negativ geladenen DNA mit positiv geladenen Lipidvesikeln dar [100]. Diese Komplexe können dann durch die permeabilisierte Membran leichter in das Zellinnere gelangen. Bei Anwendung dieser Methode gelang die Transfektion mit einem zur shRNA-Expression genutzten Vektor und einem Kontrollvektor (Abb. 22), jedoch war auch hier die Effizienz zu gering, um diese Methode für weitere Versuche zu nutzen. Die geringe Effizienz dieser Methode kann durch den beschriebenen toxischen Effekt des Lipofektionsreagenz auf die DCs zustande kommen [101,102]. Obwohl eine durch den Hersteller für die Nutzung bei DCs optimierte Vorgehensweise verwendet wurde, könnte eine weitere Anpassung des Verhältnisses von Lipofektionsreagenz zu DNA und der elektrischen Pulse zu einer Verbesserung der Transfektionseffizienz führen.

Da die vergleichsweise einfachen Methoden der Elektroporation und Lipofektion nicht zum gewünschten Erfolg führten, wurde die Transduktion von DCs mit lentiviralen Partikeln in Betracht gezogen. Bei Lentiviren handelt es sich um Retroviren, welche in der Lage sind, auch sich nicht teilende Zellen zu transduzieren [103]. Durch diese Fähigkeit stellen Lentiviren ein vielversprechendes Therapeutikum zur Immunisierung gegen Krebs dar [104–106]. Außerdem haben Lentiviren das Potential zur Korrektur von Erbkrankheiten, welche durch einen einzigen Gendefekt hervorgerufen werden, beizutragen [107–109]. Jedoch besteht auch die Möglichkeit einer Aktivierung von DCs durch die Transduktion mit lentiviralen Partikeln. Es wurde gezeigt, dass die

Verwendung von VSV-G (Vesicular stomatitis virus-Glykoprotein) pseudotypisierten Lentiviren die effizienteste Transduktion von DCs darstellt und es im Zuge der Transduktion nicht zur Veränderung der Migration und Antigenaufnahme der DCs kommt [110]. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass VSV-G pseudotypisierte Lentiviren zu einer phänotypischen und funktionellen Reifung der DCs durch die Aktivierung des Kinase R-Signalweges und der TLR 2,3 und 8 führt [111]. Durch die Gruppe von M. Bros wurde jedoch festgestellt, dass die Aktivierung der DCs weniger durch den Lentivirus an sich zustande kommt, als durch den physikalischen und mechanischen Stress der Transduktion [74]. Dieses wurde ebenfalls in Studien von Gallucci, Janmey und Kollegen untersucht [112,113]. Um die erhöhte Transduktionseffizienz der Lentiviren zum Einbringen einer shRNA in DCs zu nutzen, wurde ein kommerziell erhältlicher Vektor im Rahmen dieser Arbeit getestet. Mit diesem Vektor gelang es, die Effizienz der Transfektion von knapp 1,2 % mit der Kombination aus Elektroporation und Lipofektion auf 25 % zu steigern (Abb. 23C). Da es jedoch Bros und Kollegen möglich war mit einem lentiviralen Vektorkonstrukt eine bis zu 90 % Transfektionseffizienz zu erreichen [74], wurde dieser lentivirale Vektor für das Einbringen einer shRNA ebenfalls getestet. Dieses Vektorkonstrukt mit der von M. Bros übernommenen Transfektionsmethode zeigte eine hohe Effizienz von 90 % schon in der Transfektion der Produktionszelllinie HEK293T (Abb. 24A). Die aus der Produktionszelllinie gewonnenen lentiviralen Partikel wurden zur Transduktion der DCs verwendet und zeigten eine Effizienz von knapp 40 % (Abb. 24B). Diese ersten Ergebnisse zeigen, dass eine effiziente Transduktion von DCs mit diesem Vektorkonstrukt möglich ist. In weiteren Versuchen muss nun die Transduktion weiter optimiert und die erfolgreiche Stilllegung der Zielgene durch die im Vektor enthaltene shRNA mittels WB und qRT-PCR gezeigt werden. Hierzu könnte es hilfreich sein, die positiv transduzierten Zellen anhand der Fluoreszenz von den nicht-transduzierten Zellen zu trennen, um dann ein unverfälschtes Ergebnis sowohl für die Genexpression, als auch für die funktionelle Überprüfung der Zellen anhand von Zytokinmessungen zu haben.

#### **5.4 Untersuchung der molekularen Angriffsorte von p47phox und IRAK4 innerhalb der TLR-Signalkaskade und weiterer Interaktionspartner**

Diese Arbeit baut auf dem Ergebnis auf, dass p47phox an der Modulation der IL-12p70 Produktion innerhalb der TLR-Signalkaskade beteiligt ist [1]. Ein vollständiges Verständnis der Abläufe dieser Interaktionen liegt jedoch nicht vor und es gibt kein detailliertes Wissen darüber, wie die Signalwege zur Produktion des heterodimären IL-12p70 reguliert werden. Bisher wurden in der Literatur sowohl die Mitglieder der IRAK-Familie als auch TRAF4 als Interaktionspartner für p47phox untersucht [2,44]. Um die Interaktion von p47phox mit anderen Komponenten der TLR-Signalwege zu untersuchen, wurden verschiedene Herangehensweisen ausprobiert. Ein Hindernis bei diesen Untersuchungen stellte die Natur der DCs dar, welche nach der Isolation und Ausdifferenzierung lediglich ein paar Tage für Versuche zu nutzen sind und so für jeden Versuch unterschiedliche Chargen an DCs verwendet werden. Außerdem ist eine Manipulation der DCs durch das Einbringen von DNA zur Überexpression von Proteinen nur schwer möglich, wie schon im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Durch die geringe Menge an endogen vorhandenem Protein und das Fehlen eines guten Antikörpers gegen p47phox, war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, die Standardmethode der Co-Immunopräzipitation für die Auffindung von möglichen Interaktionspartnern zu nutzen. Als Alternative wurden der far-Westernblot (far-WB) und die Microscale Thermophoresis (MST) etabliert.

In ersten Versuchen konnte im far-WB gezeigt werden, dass humanes rekombinantes p47phox mit humanem rekombinatem IRAK4 interagiert, jedoch konnte keine Interaktion mit humanem rekombinatem TRAF4 beobachtet werden (Abb. 25 C/D). Als Kontrolle wurde die hinlänglich untersuchte Interaktion der zwei NOX-Komponenten p47phox und p67phox überprüft, welche ebenfalls im far-WB zu erkennen ist (Abb. 25A/B). Grundsätzlich ist festzustellen, dass die Methode des far-WB für die Interaktion von p47phox mit anderen Proteinen nutzbar ist. Jedoch ist in diesen ersten Versuchen lediglich eine Interaktion mit der Nutzung rekombinanter Proteine nachzuweisen. Da der Nachweis einer Interaktion aller Proteine jedoch nur bei dem Einsatz von 200 ng rekombinatem Fängerprotein möglich war, war der Nachweis von endogenem Protein aus Zelllysat unmöglich.

Um das Hindernis der Sensitivität dieser Methode zu beseitigen, wurde MST als alternative Methode eingesetzt. Hierbei ist die Messung der Interaktion von Proteinen laut Hersteller auch in geringen Mengen möglich. So wurde die Affinität von endogenem, aus primären murinen Knochenmarkszellen isoliertem p47phox zu TRAF4 oder TRAF6, ebenfalls aus primären Knochenmarkszellen isoliert, gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die schon bekannte Interaktion zwischen TRAF4 und p47phox besteht, als auch eine bis dahin nicht publizierte Interaktion zwischen TRAF6 und p47phox (Abb. 26). Diese vorläufigen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Methode der MST auch bei den geringen Mengen von isoliertem p47phox verlässliche Ergebnisse liefern kann. Für die Zukunft sollte die Wiederholung dieses Versuchs genauere Werte für die Affinität der Interaktion liefern. Außerdem wäre es möglich, vor der Messung unterschiedliche Domänen von p47phox oder den Interaktionsproteinen durch eine genetische Veränderung zu blockieren oder zu entfernen, um so ein genaueres Bild der Interaktion zu erhalten.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass beide für die Interaktion von p47phox mit anderen Proteinen verwendeten Methoden nicht in der Lage sind, die Co-IP vollständig zu ersetzen. Mit beiden Methoden ist es lediglich möglich, bestimmte Kandidaten für die Interaktionssuche zu überprüfen. Ein bis dahin nicht in Betracht gezogenes Interaktionsprotein kann sowohl im far-WB als auch bei der MST nicht gefunden werden. Jedoch ist unter den oben diskutierten Umständen die MST eine gute Alternative, da sie ermöglicht, Proteine mit geringer endogener Konzentration zu messen. Für die Zukunft wäre die Entwicklung eines guten Antikörpers gegen p47phox, sowohl für die Co-IP, als auch für die Isolation des Proteins aus dem Zelllysate und die anschließende Messung in der MST von großem Nutzen.

## 6 AUSBLICK

Diese Doktorarbeit hatte als Ziel die Modulation der IL-12p70 Produktion durch IRAK4 in DCs zu untersuchen und die Subpopulation der DCs zu charakterisieren, welche für eben diese Modulation verantwortlich sind. Gleichzeitig sollte eine Methode zum Einbringen von shRNA bzw. siRNA etabliert werden, um die Generierung von DCs mit einem spezifischen knock-out von IRAK4 oder p47phox zu ermöglichen. Des Weiteren standen die molekulare Angriffsorte von IRAK4 und p47phox innerhalb der TLR-Signalkaskade im Fokus dieser Arbeit.

Für die Untersuchung zur Modulation der IL-12p70 Produktion durch IRAK4 könnte eine weitere Messung der Zytokinsekretion von DCs aus anderen knock-out Mäusen, die eine Defizienz für mögliche Interaktionspartner im TLR-Signalweg aufweisen (TRAF6/TRAF3/NEMO etc.), eine Möglichkeit sein, um das komplexe Zusammenspiel der Signalwege zu ergründen und so den „IRAK4-Effekt“ herauszuarbeiten.

Durch FACS-Untersuchungen der primären Knochenmarkszellen war es möglich, eine grobe Aufteilung der DC-Subpopulationen durchzuführen, jedoch erfordert die genaue Charakterisierung der teilweise sehr kleinen Subpopulationen eine große Menge an Ausgangszellen. Daher sollten zur Identifikation der Population, welche den Unterschied in der TLR9-induzierten IL12p70 Produktion ausmacht, weitere Untersuchungen der Expression von Transkriptionsfaktoren mittels qRT-PCR durchgeführt werden.

Die Etablierung von Methoden zum Einbringen von sh- bzw. siRNA in DCs stellte sich als einer der wichtigsten Schritte in dieser Arbeit heraus, da durch die erfolgreiche Entwicklung einer Methode die Möglichkeit gegeben ist, auch andere Gene innerhalb dieser Zellen auszuschalten und somit ein genaueres Bild des Zusammenspiels der einzelnen TLR-Signalkomponenten zu erhalten. Der Grundstein für die Verwendung dieser Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit gelegt und der weitere Ausbau für die Anwendung, auch bei anderer Fragestellung, sollte kein großes Problem darstellen.

Die Untersuchung der molekulare Angriffsorte von p47phox und IRAK4 innerhalb der TLR-Signalkaskade und die Identifikation weiterer Interaktionspartner stellten sich mit den erprobten Methoden zunächst schwierig dar. Jedoch zeigte die Anwendung der

Microscale Thermophoresis gute Ergebnisse und es stellte sich heraus, dass mit dieser Methode weitere Untersuchungen zu anderen Interaktionspartnern durchgeführt werden können. Anhand dieser Resultate könnte dann eine Überprüfung mit erprobteren Methoden stattfinden.

Darüber hinaus ist die Manipulation von Signalwegen in DCs, und insbesondere desjenigen zu IL-12p70 führend, potenziell für die Behandlung von Autoimmunkrankheiten und für den Einsatz von DCs als Immunzellpräparat zur Behandlung von Tumoren entscheidend wichtig. Hier ist die Modulation der inhibitorischen kostimulierenden Molekülen CTLA-4 und PDL1 [114] und die Verstärkung der Adjuvansfunktion von DCs [115] besonders im aktuellen Fokus.

## 7 REFERENZEN

1. Richter C, Juan MHS, Will J, Brandes RP, Kalinke U, Akira S, Pfeilschifter JM, Hultqvist M, Holmdahl R, Radeke HH: **Ncf1 Provides a Reactive Oxygen Species-Independent Negative Feedback Regulation of TLR9-Induced IL-12p70 in Murine Dendritic Cells.** *The Journal of Immunology* 2009, **182**:4183-4191.
2. Pacquelet S, Johnson JL, Ellis BA, Brzezinska AA, Lane WS, Munafo DB, Catz SD: **Cross-talk between IRAK-4 and the NADPH oxidase.** *Biochem. J.* 2007, **403**:451-461.
3. Steinman RM: **Decisions about dendritic cells: past, present, and future.** *Annu. Rev. Immunol.* 2012, **30**:1-22.
4. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K: **Immunobiology of dendritic cells.** *Annu. Rev. Immunol.* 2000, **18**:767-811.
5. Bevan MJ: **Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay.** *J. Exp. Med.* 1976, **143**:1283-1288.
6. den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ: **CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo.** *J. Exp. Med.* 2000, **192**:1685-1696.
7. Barrio MM, Abes R, Colombo M, Pizzurro G, Boix C, Roberti MP, Gélizé E, Rodriguez-Zubieta M, Mordoh J, Teillaud J: **Human macrophages and dendritic cells can equally present MART-1 antigen to CD8(+) T cells after phagocytosis of gamma-irradiated melanoma cells.** *PLoS ONE* 2012, **7**:e40311.
8. Mosmann TR, Coffman RL: **TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.** *Annu. Rev. Immunol.* 1989, **7**:145-173.
9. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C: **A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17.** *Nat Immunol* 2005, **6**:1133-1141.
10. Langier S, Sade K, Kivity S: **Regulatory T cells: the suppressor arm of the immune system.** *Autoimmun Rev* 2010, **10**:112-115.
11. Granucci F, Zanoni I, Ricciardi-Castagnoli P: **Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses.** *Cell. Mol. Life Sci.* 2008, **65**:1683-1697.
12. Steinman RM, Cohn ZA: **Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution.** *J. Exp. Med.* 1973, **137**:1142-1162.
13. Reizis B: **Regulation of plasmacytoid dendritic cell development.** *Current Opinion in Immunology* 2010, **22**:206-211.
14. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM: **Re(de)fining the dendritic cell lineage.** *Nat Immunol* 2012, **13**:1145-1154.
15. Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhé C, Perrin P, Romani N, Tripp CH, Douillard P, Leserman L, Kaiserlian D, Saeland S, Davoust J, Malissen B: **Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells**

- colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells.** *Immunity* 2005, **22**:643-654.
16. Miller JC, Brown BD, Shay T, Gautier EL, Jojic V, Cohain A, Pandey G, Leboeuf M, Elpek KG, Helft J, Hashimoto D, Chow A, Price J, Greter M, Bogunovic M, Bellemare-Pelletier A, Frenette PS, Randolph GJ, Turley SJ, Merad M, Jakubzick C, Best AJ, Knell J, Goldrath A, Miller J, Brown B, Koller D, Cohen N, Brennan P, Brenner M *et al.*: **Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage.** *Nat Immunol* 2012, **13**:888-899.
  17. Probst HC, Tschannen K, Odermatt B, Schwendener R, Zinkernagel RM, van Den Broek M: **Histological analysis of CD11c-DTR/GFP mice after in vivo depletion of dendritic cells.** *Clin. Exp. Immunol.* 2005, **141**:398-404.
  18. Murphy KM: **Comment on "Activation of  $\beta$ -catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine".** *Science* 2011, **333**:405; author reply 405.
  19. Meredith MM, Liu K, Darrasse-Jeze G, Kamphorst AO, Schreiber HA, Guermonprez P, Idoyaga J, Cheong C, Yao K, Niec RE, Nussenzweig MC: **Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage.** *Journal of Experimental Medicine* 2012, **209**:1153-1165.
  20. Satpathy AT, KC W, Albring JC, Edelson BT, Kretzer NM, Bhattacharya D, Murphy TL, Murphy KM: **Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages.** *Journal of Experimental Medicine* 2012, **209**:1135-1152.
  21. Shi Z, Cai Z, Sanchez A, Zhang T, Wen S, Wang J, Yang J, Fu S, Zhang D: **A Novel Toll-like Receptor That Recognizes Vesicular Stomatitis Virus.** *Journal of Biological Chemistry* 2011, **286**:4517-4524.
  22. Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman RM, Romani N, Schuler G: **Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells.** *Eur. J. Immunol.* 1996, **26**:659-668.
  23. Snijders A, Kalinski P, Hilkens CM, Kapsenberg ML: **High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals.** *Int. Immunol.* 1998, **10**:1593-1598.
  24. Korhonen R, Huotari N, Hömmö T, Leppänen T, Moilanen E: **The expression of interleukin-12 is increased by MAP kinase phosphatase-1 through a mechanism related to interferon regulatory factor 1.** *Mol. Immunol.* 2012, **51**:219-226.
  25. Boonyatecha N, Sangphech N, Wongchana W, Kueanjinda P, Palaga T: **Involvement of Notch signaling pathway in regulating IL-12 expression via c-Rel in activated macrophages.** *Mol. Immunol.* 2012, **51**:255-262.
  26. Kalim KW, Groettrup M: **Prostaglandin E2 inhibits IL-23 and IL-12 production by human monocytes through down-regulation of their common p40 subunit.** *Mol. Immunol.* 2013, **53**:274-282.
  27. Gao B: **Hepatoprotective and anti-inflammatory cytokines in alcoholic liver disease.** *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2012, **27 Suppl 2**:89-93.

28. El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidallo M, Marie J, Braut-Boucher F: **p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases.** *Exp Mol Med* 2009, **41**:217.
29. Dang PM, Cross AR, Babior BM: **Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001, **98**:3001-3005.
30. Bedard K, Krause K: **The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology** [<http://physrev.physiology.org/content/87/1/245.full.pdf#page=1&view=FitH>].
31. Johnston RB: **Clinical aspects of chronic granulomatous disease.** *Curr. Opin. Hematol.* 2001, **8**:17-22.
32. Dang PM, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y, Hayem G, Jensen ON, Gougerot-Pocidallo M, El-Benna J: **A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites.** *J. Clin. Invest.* 2006, **116**:2033-2043.
33. van Lent PLEM, Nabbe KCAM, Blom AB, Sloetjes A, Holthuysen AEM, Kolls J, van de Loo FAJ, Holland SM, van Den Berg WB: **NADPH-oxidase-driven oxygen radical production determines chondrocyte death and partly regulates metalloproteinase-mediated cartilage matrix degradation during interferon-gamma-stimulated immune complex arthritis.** *Arthritis Res. Ther.* 2005, **7**:R885-95.
34. Olofsson P, Holmberg J, Tordsson J, Lu S, Åkerström B, Holmdahl R: **Positional identification of Ncf1 as a gene that regulates arthritis severity in rats.** *Nat Genet* 2002, **33**:25-32.
35. Hultqvist M: **Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the Ncf1 gene.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004, **101**:12646-12651.
36. Babior BM: **Phagocytes and oxidative stress.** *Am. J. Med.* 2000, **109**:33-44.
37. Matsue H, Edelbaum D, Shalhevet D, Mizumoto N, Yang C, Mummert ME, Oeda J, Masayasu H, Takashima A: **Generation and function of reactive oxygen species in dendritic cells during antigen presentation.** *J. Immunol.* 2003, **171**:3010-3018.
38. Kobayashi S, Imajoh-Ohmi S, Kuribayashi F, Nuno H, Nakamura M, Kanegasaki S: **Characterization of the superoxide-generating system in human peripheral lymphocytes and lymphoid cell lines.** *J. Biochem.* 1995, **117**:758-765.
39. Mizuki K, Kadomatsu K, Hata K, Ito T, Fan QW, Kage Y, Fukumaki Y, Sakaki Y, Takeshige K, Sumimoto H: **Functional modules and expression of mouse p40(phox) and p67(phox), SH3-domain-containing proteins involved in the phagocyte NADPH oxidase complex.** *Eur. J. Biochem.* 1998, **251**:573-582.
40. Sahaf B, Heydari K, Herzenberg LA, Herzenberg LA: **Lymphocyte surface thiol levels.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003, **100**:4001-4005.
41. Rutault K, Alderman C, Chain BM, Katz DR: **Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells.** *Free Radic. Biol. Med.* 1999, **26**:232-238.

42. Reth M: **Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation.** *Nat. Immunol.* 2002, **3**:1129-1134.
43. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihama T, Matsutani T, Negishi I, Nakatsuru S, Sakaguchi S: **Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice.** *Nature* 2003, **426**:454-460.
44. Takeshita F, Ishii KJ, Kobiyama K, Kojima Y, Coban C, Sasaki S, Ishii N, Klinman DM, Okuda K, Akira S, Suzuki K: **TRAF4 acts as a silencer in TLR-mediated signaling through the association with TRAF6 and TRIF.** *Eur. J. Immunol.* 2005, **35**:2477-2485.
45. Flannery S, Bowie AG: **The interleukin-1 receptor-associated kinases: Critical regulators of innate immune signalling.** *Biochemical Pharmacology* 2010, **80**:1981-1991.
46. Kuglstatter A, Villaseñor AG, Shaw D, Lee SW, Tsing S, Niu L, Song KW, Barnett JW, Browner MF: **Cutting Edge: IL-1 receptor-associated kinase 4 structures reveal novel features and multiple conformations.** *J. Immunol.* 2007, **178**:2641-2645.
47. Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, Takada H, Wakeham A, Itie A, Li S, Penninger JM, Wesche H, Ohashi PS, Mak TW, Yeh W: **Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4.** *Nature* 2002, **416**:750-756.
48. Kubo-Murai M, Hazeki K, Nigorikawa K, Omoto T, Inoue N, Hazeki O: **IRAK-4-dependent Degradation of IRAK-1 is a Negative Feedback Signal for TLR-mediated NF- $\kappa$ B Activation.** *Journal of Biochemistry* 2007, **143**:295-302.
49. Qin J, Jiang Z, Qian Y, Casanova J, Li X: **IRAK4 kinase activity is redundant for interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase phosphorylation and IL-1 responsiveness.** *J. Biol. Chem.* 2004, **279**:26748-26753.
50. Koziczak-Holbro M, Joyce C, Glück A, Kinzel B, Müller M, Tschopp C, Mathison JC, Davis CN, Gram H: **IRAK-4 kinase activity is required for interleukin-1 (IL-1) receptor- and toll-like receptor 7-mediated signaling and gene expression.** *J. Biol. Chem.* 2007, **282**:13552-13560.
51. Neumann D, Kollwe C, Pich A, Cao P, Resch K, Martin MU: **Threonine 66 in the death domain of IRAK-1 is critical for interaction with signaling molecules but is not a target site for autophosphorylation.** *J. Leukoc. Biol.* 2008, **84**:807-813.
52. Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A: **Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains.** *Shock* 2004, **22**:460-466.
53. Jackson SH, Gallin JI, Holland SM: **The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease.** *J Exp Med* 1995, **182**:751-758.
54. Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku C, Bustamante J, Yang K, Soudais C, Dupuis S, Feinberg J, Fieschi C, Elbim C, Hitchcock R, Lammass D, Davies G, Al-Ghonaium A, Al-Rayes H, Al-Jumaah S, Al-Hajjar S, Al-Mohsen IZ, Frayha HH, Rucker R, Hawn TR, Aderem A, Tufenkeji H, Haraguchi S, Day NK, Good RA, Gougerot-Pocidallo M, Ozinsky A, Casanova J: **Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency.** *Science* 2003, **299**:2076-2079.

55. Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B: **Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling.** *Nature* 2003, **424**:743-748.
56. Waibler Z, Kalinke U, Will J, Juan MHS, Pfeilschifter JM, Radeke HH: **TLR-ligand stimulated interleukin-23 subunit expression and assembly is regulated differentially in murine plasmacytoid and myeloid dendritic cells.** *Mol. Immunol.* 2007, **44**:1483-1489.
57. Sender LY, Gibbert K, Suezer Y, Radeke HH, Kalinke U, Waibler Z: **CD40 ligand-triggered human dendritic cells mount interleukin-23 responses that are further enhanced by danger signals.** *Mol. Immunol.* 2010, **47**:1255-1261.
58. Schröder M, Richter C, Juan MHS, Maltusch K, Giegold O, Quintini G, Pfeilschifter JM, Huwiler A, Radeke HH: **The sphingosine kinase 1 and S1P1 axis specifically counteracts LPS-induced IL-12p70 production in immune cells of the spleen.** *Mol. Immunol.* 2011, **48**:1139-1148.
59. Martin MU, Wesche H: **Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family.** *Biochim. Biophys. Acta* 2002, **1592**:265-280.
60. Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, Kato H, Matsui K, Kumagai Y, Saitoh T, Kawai T, Takeuchi O, Akira S: **Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2.** *Nat. Immunol.* 2008, **9**:684-691.
61. Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA, Medzhitov R, Flavell RA: **IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling.** *Cell* 2002, **110**:191-202.
62. Nardo D de, Nguyen T, Hamilton JA, Scholz GM: **Down-regulation of IRAK-4 is a component of LPS- and CpG DNA-induced tolerance in macrophages.** *Cell. Signal.* 2009, **21**:246-252.
63. Kawai T, Akira S: **Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity.** *Immunity* 2011, **34**:637-650.
64. Husebye H, Halaas Ø, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger Ø, Bogen B, Brech A, Latz E, Espevik T: **Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity.** *EMBO J.* 2006, **25**:683-692.
65. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R: **TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta.** *Nat. Immunol.* 2008, **9**:361-368.
66. Tanimura N, Saitoh S, Matsumoto F, Akashi-Takamura S, Miyake K: **Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008, **368**:94-99.
67. Palsson-McDermott EM, Doyle SL, McGettrick AF, Hardy M, Husebye H, Banahan K, Gong M, Golenbock D, Espevik T, O'Neill LAJ: **TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway.** *Nat. Immunol.* 2009, **10**:579-586.
68. Blasius AL, Beutler B: **Intracellular toll-like receptors.** *Immunity* 2010, **32**:305-315.
69. Ermolaeva MA, Michallet M, Papadopoulou N, Utermöhlen O, Kranidioti K, Kollias G, Tschopp J, Pasparakis M: **Function of TRADD in tumor necrosis**

- factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses.** *Nat. Immunol.* 2008, **9**:1037-1046.
70. Weber A, Wasiliew P, Kracht M: **Interleukin-1 (IL-1) pathway.** *Sci Signal* 2010, **3**:cm1.
71. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA: **IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines.** *Immunity* 2005, **23**:479-490.
72. Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, Randolph GJ: **Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity.** *Nat Rev Immunol* 2010, **10**:453-460.
73. Crozat K, Tamoutounour S, Vu Manh T, Fossum E, Luche H, Ardouin L, Williams M, Azukizawa H, Bogen B, Malissen B, Henri S, Dalod M: **Cutting Edge: Expression of XCR1 Defines Mouse Lymphoid-Tissue Resident and Migratory Dendritic Cells of the CD8 + Type.** *The Journal of Immunology* 2011, **187**:4411-4415.
74. Besche V, Wiechmann N, Castor T, Trojandt S, Höhn Y, Kunkel H, Grez M, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M: **Dendritic cells lentivirally engineered to overexpress interleukin-10 inhibit contact hypersensitivity responses, despite their partial activation induced by transduction-associated physical stress.** *J. Gene Med.* 2010:n/a.
75. Reis e Sousa C, Hieny S, Scharton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A: **In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas.** *J. Exp. Med.* 1997, **186**:1819-1829.
76. Kortylewski M, Xin H, Kujawski M, Lee H, Liu Y, Harris T, Drake C, Pardoll D, Yu H: **Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment.** *Cancer Cell* 2009, **15**:114-123.
77. Illes Z, Safrany E, Peterfalvi A, Magyari L, Farago B, Pozsonyi E, Rozsa C, Komoly S, Melegh B: **3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis.** *Neurosci. Lett.* 2008, **431**:36-38.
78. Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL, Pittman D, Wang F, Chamian F, Dhodapkar M, Krueger JG: **Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris.** *J. Exp. Med.* 2004, **199**:125-130.
79. Nitto D de, Sarra M, Cupi ML, Pallone F, Monteleone G: **Targeting IL-23 and Th17-cytokines in inflammatory bowel diseases.** *Curr. Pharm. Des.* 2010, **16**:3656-3660.
80. Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, Waal Malefyt R de, Kastelein RA, Cua DJ: **IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity.** *Immunol. Rev.* 2004, **202**:96-105.
81. Medvedev AE, Lentschat A, Kuhns DB, Blanco JC, Salkowski C, Zhang S, Arditi M, Gallin JI, Vogel SN: **Distinct Mutations in IRAK-4 Confer Hyporesponsiveness to Lipopolysaccharide and Interleukin-1 in a Patient with Recurrent Bacterial Infections.** *Journal of Experimental Medicine* 2003, **198**:521-531.

82. Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivos N, Beyaert R, Tschopp J: **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.** *Journal of Experimental Medicine* 2003, **197**:263-268.
83. Snijders A, Hilkens CM, van der Pouw Kraan TC, Engel M, Aarden LA, Kapsenberg ML: **Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit.** *J. Immunol.* 1996, **156**:1207-1212.
84. Takeda K, Kaisho T, Akira S: **Toll-like receptors.** *Annu. Rev. Immunol.* 2003, **21**:335-376.
85. Guilliams M, Henri S, Tamoutounour S, Ardouin L, Schwartz-Cornil I, Dalod M, Malissen B: **From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets.** *Eur. J. Immunol.* 2010, **40**:2089-2094.
86. Huang LY, Reis e Sousa C, Itoh Y, Inman J, Scott DE: **IL-12 induction by a TH1-inducing adjuvant in vivo: dendritic cell subsets and regulation by IL-10.** *J. Immunol.* 2001, **167**:1423-1430.
87. Yrlid U, Wick MJ: **Antigen presentation capacity and cytokine production by murine splenic dendritic cell subsets upon Salmonella encounter.** *J. Immunol.* 2002, **169**:108-116.
88. Reis e Sousa C: **Dendritic cells in a mature age.** *Nat Rev Immunol* 2006, **6**:476-483.
89. Ginhoux F, Liu K, Helft J, Bogunovic M, Greter M, Hashimoto D, Price J, Yin N, Bromberg J, Lira SA, Stanley ER, Nussenzweig M, Merad M: **The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs.** *J. Exp. Med.* 2009, **206**:3115-3130.
90. Edelson BT, KC W, Juang R, Kohyama M, Benoit LA, Klekotka PA, Moon C, Albring JC, Ise W, Michael DG, Bhattacharya D, Stappenbeck TS, Holtzman MJ, Sung SJ, Murphy TL, Hildner K, Murphy KM: **Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells.** *J. Exp. Med.* 2010, **207**:823-836.
91. Helft J, Ginhoux F, Bogunovic M, Merad M: **Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice.** *Immunol. Rev.* 2010, **234**:55-75.
92. Dorner BG, Dorner MB, Zhou X, Opitz C, Mora A, Güttler S, Hutloff A, Mages HW, Ranke K, Schaefer M, Jack RS, Henn V, Kroczeck RA: **Selective Expression of the Chemokine Receptor XCR1 on Cross-presenting Dendritic Cells Determines Cooperation with CD8+ T Cells.** *Immunity* 2009, **31**:823-833.
93. Satpathy AT, Murphy KM, KC W: **Transcription factor networks in dendritic cell development.** *Semin. Immunol.* 2011, **23**:388-397.
94. Schiavoni G, Mattei F, Sestili P, Borghi P, Venditti M, Morse HC, Belardelli F, Gabriele L: **ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells.** *J. Exp. Med.* 2002, **196**:1415-1425.
95. Wang H, Morse HC: **IRF8 regulates myeloid and B lymphoid lineage diversification.** *Immunol. Res.* 2009, **43**:109-117.

96. Heng TSP, Painter MW: **The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells.** *Nat. Immunol.* 2008, **9**:1091-1094.
97. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, Calderon B, Schraml BU, Unanue ER, Diamond MS, Schreiber RD, Murphy TL, Murphy KM: **Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity.** *Science* 2008, **322**:1097-1100.
98. Escoffre J, Portet T, Wasungu L, Teissié J, Dean D, Rols M: **What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues.** *Mol. Biotechnol.* 2009, **41**:286-295.
99. Rols M: **Mechanism by which electroporation mediates DNA migration and entry into cells and targeted tissues.** *Methods Mol. Biol.* 2008, **423**:19-33.
100. Wikipedia-Autoren sV: **Transfektion**  
[<http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Transfektion&oldid=118722707>].
101. Tros de Ilarduya C, Sun Y, Düzgüneş N: **Gene delivery by lipoplexes and polyplexes.** *Eur J Pharm Sci* 2010, **40**:159-170.
102. Zhang S, Zhao Y, Zhao B, Wang B: **Hybrids of nonviral vectors for gene delivery.** *Bioconjug. Chem.* 2010, **21**:1003-1009.
103. Barker E, Planelles V: **Vectors derived from the human immunodeficiency virus, HIV-1.** *Front. Biosci.* 2003, **8**:d491-510.
104. Yang HG, Hu BL, Xiao L, Wang P: **Dendritic cell-directed lentivector vaccine induces antigen-specific immune responses against murine melanoma.** *Cancer Gene Ther.* 2011, **18**:370-380.
105. Breckpot K, Emeagi PU, Thielemans K: **Lentiviral vectors for anti-tumor immunotherapy.** *Curr Gene Ther* 2008, **8**:438-448.
106. He Y, Munn D, Falo LD: **Recombinant lentivector as a genetic immunization vehicle for antitumor immunity.** *Expert Rev Vaccines* 2007, **6**:913-924.
107. Nguyen TH, Aubert D, Bellodi-Privato M, Flageul M, Pichard V, Jaidane-Abdelghani Z, Myara A, Ferry N: **Critical assessment of lifelong phenotype correction in hyperbilirubinemic Gunn rats after retroviral mediated gene transfer.** *Gene Ther.* 2007, **14**:1270-1277.
108. Merle U, Encke J, Tuma S, Volkmann M, Naldini L, Stremmel W: **Lentiviral gene transfer ameliorates disease progression in Long-Evans cinnamon rats: an animal model for Wilson disease.** *Scand. J. Gastroenterol.* 2006, **41**:974-982.
109. Di Domenico C, Di Napoli D, Gonzalez Y, Reyero E, Lombardo A, Naldini L, Di Natale P: **Limited transgene immune response and long-term expression of human alpha-L-iduronidase in young adult mice with mucopolysaccharidosis type I by liver-directed gene therapy.** *Hum. Gene Ther.* 2006, **17**:1112-1121.
110. Metelo J, Ward N, Thrasher AJ, Burns SO: **Lentivectors are efficient tools to manipulate the dendritic cell cytoskeleton.** *Cytoskeleton* 2011, **68**:434-445.
111. Breckpot K, Emeagi P, Dullaers M, Michiels A, Heirman C, Thielemans K: **Activation of immature monocyte-derived dendritic cells after transduction with high doses of lentiviral vectors.** *Hum. Gene Ther.* 2007, **18**:536-546.
112. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P: **Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells.** *Nat. Med.* 1999, **5**:1249-1255.

113. Janmey PA, McCulloch CA: **Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli.** *Annu Rev Biomed Eng* 2007, **9**:1-34.
114. Tullett KM, Lahoud MH, Radford KJ: **Harnessing Human Cross-Presenting CLEC9A(+)XCR1(+) Dendritic Cells for Immunotherapy.** *Frontiers in immunology* 2014, **5**:239.
115. Datta J, Terhune JH, Lowenfeld L, Cintolo JA, Xu S, Roses RE, Czerniecki BJ: **Optimizing Dendritic Cell-Based Approaches for Cancer Immunotherapy.** *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE* 2014, **87**:491-518.

## 8 APPENDIX

### 8.1 Abkürzungen

APC	Antigen presenting cell
APS	Amonium Peroxidsulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar
BSA	Bovine serum albumin
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CD	Cluster of Differentiation
DC	dendritische Zelle
DD	Death Domain/Todesdomäne
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
cDC	konventionelle/klassische DC
cDNA	komplementäre DNA
CGD	Chronic Granulomatose Disease
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DC	Denritic cell
DHE	Dihydroethidium
DNA	Desoxy-ribonucleic acid
dNTP	Desoxy-nucleoside triphosphate
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENU	N-Nitroso-N-ethylurea
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAM	Carboxyfluorescein
FCS	Fetal calf serum
Flt3	FMS-like tyrosine kinase 3

g	Gram
g <sub>n</sub>	mittlere Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HEK293T	humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEPES-KOH	HEPES-Kaliumhydroxid
HIV-1	Humaner Immundefizienzvirus Typ 1
HRP	Horseradish peroxidase
IFN	Interferon
IKK	Inhibitor of nuclear factor-κB-kinase
IL	Interleukin
IRAK	IL-1R-associated kinase
IRF	Interferon regulatory kinase
JAK	Janus Kinase
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat
KM	Knochenmark
KO	Knock-out
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LV	lentivirale Vektoren
M	mol/l
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	Major histocompatibility complex
Min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol/l
mm	Millimeter

mmol	Millimol
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunde
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintetraessigsäure
NaF	Natriumfluorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	Dinatriumphosphat-Heptahydrat
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
Ncf1	Neutrophil cytosolic factor 1
NEMO	NF-κB essential modulator
ng	Nanogramm
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NF-κB	Nuclear factor κB
NK	Natürliche Killerzelle
nM	Nanomol/l
NP-40	Nonidet P-40/Oxtoxinol 9
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pDC	Plasmacytoid DC
pH	pH-Wert
pmol	Pikomol
PI	Proteinase Inhibitor
PolyI:C	Polyinosinic:polycytidylic acid
PRR	Pattern recognition receptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Echtzeit PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
S1P	Sphingosin-1-Phosphate
SEM	Standard error of the mean

---

SDS	Natriumlaurylsulfat
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAB	TAK1-binding protein
TAK1	Transforming growth factor activated kinase 1
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TANK	TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator
TBK1	TANK binding kinase 1
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helferzelle
TIR	Toll/IL-1 receptor
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRIF	TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polysorbat 20
ÜN	über Nacht
V	Volt
WT	Wildtyp
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromol/l

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Zelluläre Bestandteile des Blutes	7
Abb. 2 Unterscheidung von DC-Subpopulationen	13
Abb. 3 Die TLR-Signalwege und assoziierte Signalkomponenten	15
Abb. 4 Interleukin-12 Zytokinfamilie	17
Abb. 5 Funktionelle Domänen der humanen IRAK-Proteine	22
Abb. 6 Induzierbarer lentiviraler Vektor zur Transfektion von DCs	31
Abb. 7 Plasmide zur Herstellung von lentiviralen Vektoren 1	33
Abb. 8 Plasmide zur Herstellung von lentiviralen Vektoren 2	35
Abb. 9 Aufbau der Western Blot Apparatur	46
Abb. 10 IL-12p70 Sekretion nach TLR9-Stimulation in DCs	51
Abb. 11 IL-12p70 Sekretion nach TLR4-Stimulation in DCs	52
Abb. 12 mRNA-Expression der IL-12 Untereinheiten nach TLR-Stimulation	53
Abb. 13 Zytokinsekretion nach TLR9-Stimulation in DCs	54
Abb. 14 Zytokinsekretion nach TLR4-Stimulation in DCs	55
Abb. 15 mRNA-Expression der IRAK-Proteine nach TLR9-Stimulation	57
Abb. 16 mRNA-Expression der IRAK-Proteine nach TLR4-Stimulation	58
Abb. 17 IL-12p70 Sekretion nach Stimulation mit reinem LPS	59
Abb. 18 IL-12p70 Sekretion nach TLR-Kostimulation in DCs	61
Abb. 19 Subpopulationen primärer muriner Knochenmarkszellen	64
Abb. 20 Expression von Zbtb46 in primären murinen Knochenmarkszellen	65
Abb. 21 Elektroporation von DCs mit Einbringen von siRNA	67
Abb. 22 Transfektion von DCs mittels Nucleofector	69
Abb. 23 Transduktion von DCs mit pTRIPZ	70
Abb. 24 Transfektion und Transduktion mit pcDH1-copGFP	72

Abb. 25 Interaktion von p67phox, TRAF4 und IRAK4 mit p47phox im Far-Western Blot 74

Abb. 26 Interaktion von TRAF4 und TRAF6 mit p47phox 75

### 8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Arten und Vorkommen von NADPH-Oxidase 19

Tab. 2 Substanzen zur Stimulation primärer muriner Knochenmarkszellen 28

Tab. 3 siRNA zur Elektroporation primärer muriner Knochenmarkszellen 29

Tab. 4 Varianten des lentiviralen Vektors pTRIPZ 31

Tab. 5 RT-PCR Programm zur Herstellung von cDNA 39

Tab. 6 Genotypisierungsprimer 40

Tab. 7 Mastermixe für die qualitative PCR 40

Tab. 8 Thermocycler-Programm für Genotypisierungen 41

Tab. 9 Mastermixe für die qRT-PCR 41

Tab. 10 Thermocycler-Programm für qRT-PCR 42

Tab. 11 Zusammensetzung von SDS-Page Gelen 44

Tab. 12 Antikörper zur Detektion von Proteinen im Western Blot 47

Tab. 13 Puffer zur Proteinrenaturierung 48

Tab. 14 Fluoreszenzmarkierte Antikörper für die FACS-Färbung 49

### 8.4 Publikationen, Kongressbeiträge und Vorträge

#### 8.4.1 Publikationen

Pfarr K; Danciu C; Arlt O; Neske C; Dehelean C; Pfeilschifter JM., Radeke HH.: **Simultaneous and dose dependent melanoma cytotoxic and immune stimulatory activity of betulin.** *PLoS ONE* 2015, 10(3):e0118802.

### 8.4.2 Posterbeiträge

*77. Jahrestagung der DGPT*, Frankfurt am Main (Deutschland), 2011:  
Neske C., Richter C., Martin M.U., Pfeilschifter J.M., Radeke H.H.  
Characterizing the role of p47phox and its interaction partners in TLR signaling.

*Joint Annual Meeting der SIICA und DFfI*, Riccione (Italien), 2011:  
Neske C., Richter C., Martin M.U., Pfeilschifter J.M., Radeke H.H.  
Characterizing the role of p47phox and its interaction partners in TLR signaling.

*World Immune Regulation Meeting VI*, Davos (Schweiz), 2012:  
Neske C., Richter C., Martin M.U., Pfeilschifter J.M., Radeke H.H.  
Characterizing the role of p47phox and its interaction partners in TLR signaling.

### 8.4.3 Vorträge

*Summer School des Graduiertenkollegs „GK1172 - Biologicals“*, 2010:  
Role of p47phox and its interaction partners in dendritic cell TLR signaling and  
methods for analysis

*Retreat des Instituts für Allgemeine Pharmakologie*, 2010:  
The role of p47phox and its interaction partners in dendritic cell TLR signaling

*Winter School des Graduiertenkollegs „GK1172 - Biologicals“*, 2011:  
Role of p47phox and its interaction partners in dendritic cell TLR signaling and  
methods for analysis

*Summer School des Graduiertenkollegs „GK1172 - Biologicals“*, 2011:  
Role of p47phox and its interaction partners in dendritic cell TLR signaling and  
methods for analysis

*Retreat des Instituts für Allgemeine Pharmakologie*, 2011:  
The role of p47phox and its interaction partners in dendritic cell TLR signaling

*Winter School des Graduiertenkollegs „GK1172 - Biologicals“*, 2012:  
Role of p47phox and IRAK4 in dendritic cell TLR signaling

***Summer School des Graduiertenkollegs „GK1172 - Biologicals“, 2012:***

Role of p47phox and IRAK4 in dendritic cell TLR signaling

***Retreat des Instituts für Allgemeine Pharmakologie, 2012:***

Role of p47phox and IRAK4 in dendritic cell TLR signaling

## 9 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Heinfried H. Radeke danke ich für die Bereitstellung dieses anspruchsvollen Themas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Seine Ermutigung und Bereitschaft zur wissenschaftlichen Eigeninitiative haben viel zur Entwicklung meiner beruflichen Fähigkeiten beigetragen.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die persönliche Unterstützung im Labor. Trotz experimenteller Rückschläge und Probleme war es immer eine Freude mit Euch zu arbeiten!

Ich danke Herrn Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter für die Möglichkeit, meine Promotion im Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie durchführen zu können. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf P. Brandes und Priv.-Doz. Dr. Zoe Waibler für die Bereitstellung der in dieser Dissertation verwendeten Mäuse, sowie bei Prof. Dr. Ralf Schubert für die Unterstützung und Durchführung des CBA. Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. Michael U. Martin für seine Bereitschaft zur Diskussion meiner Ergebnisse und seiner konstruktiven Kritik und Unterstützung jeglicher Art.

Ich bedanke mich bei meinen zwei Betreuern innerhalb des Graduiertenkollegs 1172, Prof. Dr. Beatrix Süß und Priv.-Doz. Dr. Dr. Albrecht Piiper, die das Voranschreiten meiner Doktorarbeit mit hilfreichen Diskussionen und Vorschlägen unterstützt haben. Des Weiteren danke ich den beiden Koordinatoren des GRK bzw. von FIRST, Silvia Koob und Dr. Brigitte Held, ohne deren Unterstützung die Inhalte der Veranstaltungen bestimmt nicht so interessant gewesen wären. Den Doktoranden des Graduiertenkollegs danke ich für den wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Austausch während diverser Winter- und Summerschools.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, allen voran meinen Eltern, die mit ihrer Unterstützung und ihrem Glauben an meine Fähigkeiten, mich zu der Person heranwachsen lassen haben, die ich heute bin.

Mein größter Dank jedoch gilt meinem Mann, welcher mich bei meinen Zielen stets unterstützt hat und mir während der gesamten Doktorarbeit immer wieder großen Rückhalt und Kraft gegeben hat. Ohne Dich wäre alles nicht möglich gewesen!

## **10 LEBENS LAUF**

## 11 SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Modulation der Zytokinproduktion durch Interaktionen von IRAK4 und p47phox  
mit den TLR-Signalwegen**

im pharmazentrum frankfurt, Institut für Allgemeine Pharmakologie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Heinfried Radeke mit Unterstützung durch Prof. Dr. Beatrix Süß und PD Dr. Dr. Albrecht Piiper ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

---

Ort, Datum

---

Christina Neske