

Regulation der Toll-like Rezeptor-
vermittelten Signaltransduktion durch die
hämatopoetische GTPase RhoH

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Vorgelegt von
Diplom-Biologin Daniela Metzdorf
aus Tettwang

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Vorgelegt von
Diplom-Biologin Daniela Metzdorf
aus: Tett nang

Tag der mündlichen Prüfung:

Regulation der Toll-like Rezeptor-
vermittelten Signaltransduktion durch die
hämatopoetische GTPase RhoH

Gutachter: Prof. Dr. Alexander Dalpke
Prof. Dr. Michael Lanzer

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Department für Infektiologie in der Abteilung Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Heidelberg angefertigt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zu deren Gelingen beigetragen haben.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Klaus Heeg für die freundliche Aufnahme in die Abteilung und die sehr guten Arbeitsbedingungen.

Mein bester Dank gilt PD Dr. Katharina Kubatzky für die interessante Themenstellung und die damit verbundene Gelegenheit zur Erlernung neuer wissenschaftlicher Techniken. Trotz ihrer vielen Verpflichtungen stand sie mir jederzeit mit wertvollen Anregungen, Diskussionen, praktischen Ratschlägen und viel Geduld zur Seite.

Bei Prof. Dr. Alexander Dalpke und Prof. Dr. Michael Lanzer möchte ich mich für die Begutachtung meiner Arbeit sowie die Bereitschaft als Mitglied meines PhD-Komitees zu fungieren bedanken. Dem gesamten PhD-Komitee danke ich für wissenschaftliche Anregungen und kritische Anmerkungen.

Ein herzlicher Dank geht auch an PD. Dr. Tobias Dick und an Dr. Friedrich Frischknecht für die Bereitschaft als Prüfer an meiner Disputation teilzunehmen.

Gabriele Sonnenmoser danke ich für die Unterstützung im Labor, insbesondere bei der Genotypisierung der RhoH^{-/-} Mäuse und für die vielen praktischen Tipps. Bei Bianca Kloos und Maria Gonzalez möchte ich mich für die vielen lustigen Momente im Laboralltag bedanken.

Allen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe danke ich für die große Hilfsbereitschaft und das hervorragende Arbeitsklima.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinem Mann Tobias und meiner Familie für die seelische Unterstützung und den moralischen Zuspruch bedanken.

Abkürzungsverzeichnis

BCA	Bicinchoninsäure
BCR	englisch: B cell receptor
BMMCs	Aus dem Knochenmark generierte Mastzellen
BMMΦs	Aus dem Knochenmark generierte Makrophagen
BSA	englisch: Bovine Serum Albumin
CDTA	Trans 1,2 Diaminocyclohexan-N, N, N', N'-tetraceticacid
ChiP	englisch: Chromatin Immunoprecipitation
CpG	CpG-Oligodesoxynukleotid
DDT	Dithiothreitol
DIGE	englisch: Differential in Gel Electrophoresis
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	englisch: Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
EMSA	englisch: Electrophoretic Mobility Shift Assay
FACS	englisch: Fluorescence Activated Cell Sorting
FcεRI	hoch affiner IgE Rezeptor
FCS	englisch: Fetal Calf Serum
GAPs	englisch: GTPase-activating proteins
GDI	englisch: guanine nucleotide dissociation inhibitors
GEFs	englisch: guanine nucleotide exchange factors
fw	englisch: forward
h	englisch: hour
HEK Zellen	englisch: human embryonic kidney cells
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
LRR	englisch: leucine rich repeat
Mal	englisch: MyD88-adapter-like
M-CSF	Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
MyD88	englisch: myeloid differentiation factor 88

Min	Minute
NEB	New England Biolabs
P3C	Pam ₃ Cys-Ser-(Lys) ₄
PAMPs	englisch: pathogen associated molecular patterns
PBS	englisch: Phosphate Buffered Saline
PCR	englisch: Polymerase Chain Reaction
PGN	Peptidoglykan
PIC	englisch: Polyinosinic-polycytidylic acid
PIG	pMX-IRES-GFP Vektor
P/S	Penicillin/Streptomycin
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	englisch: Real Time PCR
rv	englisch: reverse
SDS	englisch: Sodium Dodecyl Sulfate
sec	Sekunde
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TCR	englisch: T cell receptor
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TLR	englisch: Toll-like receptor
TNE	TRIS-Natrium-EDTA
TRAM	englisch: TRIF related adapter molecule
TRIF	englisch: TIR domain-containing adapter inducing IFN- β
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
WB	englisch: Western Blot
wt	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
	Summary	2
2	Einleitung	3
2.1	Proteinfamilie der kleinen GTPasen	3
2.2	Die Familie der Rho-GTPasen.....	4
2.2.1	Funktion der Rho-GTPasen	4
2.2.2	Aktivierung der Rho-GTPasen.....	5
2.2.3	Struktur der Rho-GTPasen.....	6
2.3	Besonderheiten der atypischen Rho-GTPase RhoH	7
2.4	Die angeborene Immunantwort	8
2.4.1	Toll-like Rezeptoren.....	9
2.4.2	Signaltransduktion durch Toll-like Rezeptoren	10
2.4.3	Toll-like Rezeptoren als Modulatoren der Mastzellfunktion.....	12
3	Zielsetzung	14
4	Material und Methoden	15
4.1	Geräte	15
4.2	Verbrauchsmaterial	16
4.3	Chemikalien.....	17
4.4	Puffer und Stocklösungen.....	19
4.4.1	Puffer	19
4.4.2	Stocklösungen	20
4.5	Mäuse	21
4.5.1	Genotypisierung von Mäusen der RhoH ^{-/-} Zucht.....	21
4.5.2	Gewinnung von Knochenmark	23
4.5.3	Generierung von Makrophagen.....	23
4.5.4	Generierung von Mastzellen	24
4.6	Zelllinien.....	24
4.6.1	IL-3 produzierende X63Ag8 Zellen	24
4.6.2	M-CSF produzierende L929 Zellen	24
4.6.3	Raw 264.7	25
4.7	Verwendete Stimuli und Inhibitoren.....	25
4.7.1	Stimuli	25

4.7.2	Inhibitoren.....	26
4.8	Luziferase Reportergen Assay	26
4.9	Quantitative RT-PCR	27
4.10	Westernblot.....	28
4.11	Immunpräzipitation.....	30
4.12	ELISA.....	30
4.13	FACS	30
4.14	Hexosaminidase Assay.....	31
4.15	Statistik	32
5	Ergebnisse	33
5.1	RhoH im TLR-Signalweg von Mastzellen	33
5.1.1	Auswirkungen der RhoH-Defizienz auf die Mastzellendifferenzierung	33
5.1.2	Einfluss von RhoH auf die Degranulation von Mastzellen	34
5.1.3	Einfluss von RhoH auf die Zytokinproduktion von Mastzellen	35
5.1.4	Einfluss von RhoH auf die TLR-Expression von Mastzellen.....	38
5.2	RhoH im TLR-Signalweg von Makrophagen	40
5.2.1	Regulation der RhoH-Expression durch TLR-Liganden.....	40
5.2.2	Auswirkungen der RhoH-Defizienz auf die Differenzierung von Makrophagen	41
5.2.3	Einfluss von RhoH auf die Zytokin-Produktion von Makrophagen	43
5.2.4	Einfluss von RhoH auf die TLR-Expression von Makrophagen	45
5.2.5	Die Funktion von Syk in der TLR-vermittelten Signaltransduktion von Makrophagen.....	48
6	Diskussion	51
7	Literatur	61
8	Veröffentlichungen, Präsentationen und Stipendien	67
8.1	Veröffentlichungen	67
8.2	Präsentationen.....	67
8.2.1	Vorträge	67
8.2.2	Posterpräsentationen.....	67
8.3	Stipendien	68

1 Zusammenfassung

Die atypische Rho-GTPase RhoH ist an der Signalweiterleitung vieler Immunrezeptoren beteiligt. So wurde beschrieben, dass sowohl T-Zell Rezeptor (TCR)- als auch Fcε Rezeptor (FcεRI)-vermittelte Signalkaskaden RhoH-abhängig verlaufen. RhoH-defiziente Mastzellen zeigten daher eine eingeschränkte Degranulation und Zytokin-Produktion nach FcεRI-Stimulation. Ein wichtiger Transkriptionsfaktor der Zytokin-Produktion ist NFκB. Neben adaptiven Immunprozessen gibt es auch viele Signalwege des angeborenen Immunsystems, die zu einer NFκB-Aktivierung führen und somit potentiell durch RhoH beeinflusst werden. Ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind die Toll-like Rezeptoren (TLR). Als so genannte Mustererkennungsrezeptoren binden sie an konservierte pathogene Strukturen. Nach erfolgter Liganden-Bindung wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die zu einer NFκB-abhängigen Zytokin-Expression führt. Durch die freigesetzten Zytokine werden weitere Immunzellen an den Entzündungsherd gelockt und eine Immunantwort eingeleitet.

In dieser Arbeit wurde die Funktion von RhoH im TLR-Signalweg von Mastzellen und Makrophagen untersucht. Zunächst konnte gezeigt werden, dass RhoH auch von Makrophagen exprimiert wird. Da RhoH konstitutiv aktiv ist, scheint es wahrscheinlich, dass die Expression streng reguliert wird, um selektive Funktionen zu ermöglichen. In Versuchen mit murinen Makrophagen führte die Stimulation von Toll-like Rezeptoren zu einer Abnahme der RhoH-Expression. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass RhoH-defiziente Makrophagen nach TLR-Stimulation verstärkt pro-inflammatorische Zytokine wie TNF, IL-6 und IL-12p40 produzieren. Im Gegensatz dazu war die Produktion des inhibitorischen Zytokins IL-10 in diesen Zellen eingeschränkt. Mastzellen von RhoH-defizienten Mäusen zeigten dagegen einen allgemeinen Defekt in der Zytokin-Produktion. Das veränderte Stimulationsverhalten RhoH-defizienter Makrophagen und Mastzellen lässt sich vermutlich auf eine verminderte Syk-Aktivierung dieser Zellen zurückführen. Syk ist eine Kinase, die eine entscheidende Rolle im FcεRI-Signalweg von Mastzellen spielt und deren Aktivität RhoH-abhängig ist. Außerdem wurde eine Beteiligung von Syk an der TLR-Signaltransduktion von Monozyten und Makrophagen beobachtet. In dieser Arbeit konnte für murine Makrophagen eine Korrelation der Syk-Inhibition mit einer verstärkten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und einer eingeschränkten Produktion des inhibitorischen Zytokins IL-10 nachgewiesen werden. Somit scheint diese Kinase in Makrophagen einen negativen Feedbackmechanismus der pro-inflammatorischen Zytokin-Produktion zu induzieren.

Summary

RhoH is a haematopoiesis-specific, GTPase-deficient member of the Rho family of small GTPases. Because of its GTPase-deficiency, RhoH remains in an active, GTP-bound state. Thus a mechanism for controlling RhoH function is likely to exist at the transcriptional or post-translational level. Expression of RhoH was found to be crucial for immune-receptor-signaling of B cells, T cells and mast cells. In mast cells RhoH regulates Fc ϵ -receptor (Fc ϵ RI)-induced degranulation and cytokine production by facilitating Syk-activation. Additionally, RhoH affects RhoA- and Rac1-mediated NF κ B-activation in Jurkat cells. NF κ B is a transcription factor that modulates cytokine production through receptors of the adaptive and the innate immune system. Toll-like receptors (TLRs) are important pathogen recognition receptors of the innate immune system. Signaling through TLRs leads to the activation of transcription factors such as NF κ B followed by the induction of pro-inflammatory cytokines. Within this work the function of RhoH in TLR-signaling of mast cells and macrophages was analyzed. Besides the well described expression of RhoH in T cells, B cells and mast cells, we also found considerable levels of RhoH mRNA in murine macrophages. In these cells we could show that expression of RhoH can be regulated by stimulation with artificial TLR-ligands. Experiments with macrophages from RhoH deficient mice revealed an increased production of pro-inflammatory cytokines like TNF, IL-6 and IL-12p40 in the absence of RhoH. In contrast, production of the inhibitory cytokine IL-10 was impaired in these cells. However, mast cells from RhoH-deficient mice had a general defect in cytokine production. As RhoH expression is indispensable for Syk-activation in mast cells and because Syk was found to be a regulator for TLR-signaling in monocytes and macrophages, we suspected that alterations in TLR-mediated cytokine production are probably due to an impaired Syk-activation of RhoH-deficient cells. In fact our experiments indicate that TLR-mediated Syk activation is RhoH-dependent and Syk-inhibition reflects the phenotype of RhoH-deficient macrophages. Taken together, our data suggest RhoH as a molecular switch that allows cells to fine-tune their response to TLR-mediated inflammation through a Syk-dependent feedback mechanism.

2 Einleitung

2.1 Proteinfamilie der kleinen GTPasen

Die Familie der kleinen GTPasen besteht aus 20-25 kDa großen, monomeren Proteinen, die auf Grund ihrer Fähigkeit GTP zu hydrolysieren als GTPasen bezeichnet werden. Insgesamt setzt sich die Familie der kleinen GTPasen aus mehr als 150 Mitgliedern zusammen. Diese werden wiederum, basierend auf Unterschieden in Funktion und Struktur, 5 Untergruppen zugeordnet: den Ras, Rho-, Rab-, Arf- und Ran-Proteinen (Abbildung 1).

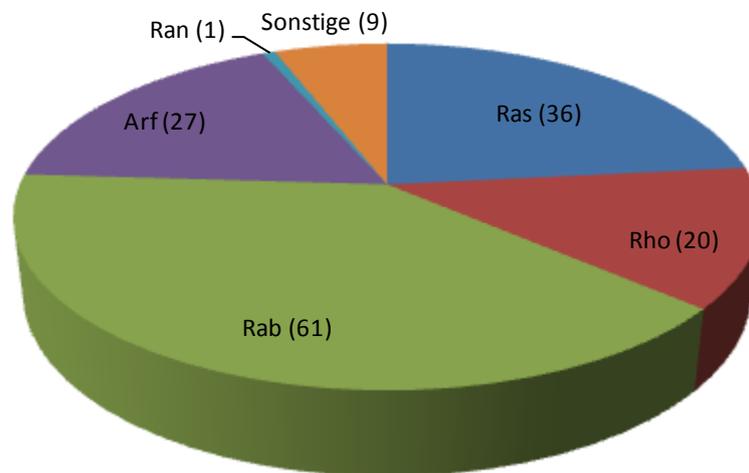


Abbildung 1: Proteinfamilie der humanen, kleinen GTPasen. Insgesamt gibt es 154 humane, kleine GTPasen, die sich in die 5 Untergruppen Ras, Rho, Rab, Arf und Ran aufteilen. Die Untergruppe der Ras-Familie besteht aus 36 Mitgliedern, die der Rho-Familie aus 20, die der Rab-Familie aus 61 und die der Arf-Familie aus 27 Proteinen. Außerdem gibt es eine Ran-GTPase und 9 GTPasen, die keinen der 5 Hauptgruppen zugeordnet werden (Modifiziert nach Vigil et al., Nature Reviews, 2010).

Kleine GTPasen sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. Hauptaufgabe der Ras-Proteine ist die Regulation der Zellproliferation und Differenzierung. Des Weiteren beteiligen sie sich an Vorgängen der Signaltransduktion und der Genexpression [1]. Rho-Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Durch die Kontrolle des Zytoskeletts haben sie Einfluss auf Zellproliferation, Migration und Phagozytose [2-6]. Außerdem beeinflussen Rho-Proteine verschiedenste Signaltransduktionsprozesse so wie Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen. Rab- und Arf-Proteine kontrollieren den intrazellulären Vesikeltransport und damit verbundene Endozytose-

und Sekretionsvorgänge. Die Funktion der Ran-GTPase besteht darin den Transport zwischen Zytoplasma und Zellkern zu kontrollieren [1].

2.2 Die Familie der Rho-GTPasen

2.2.1 Funktion der Rho-GTPasen

Die Familie der humanen und murinen Rho-GTPasen umfasst bis zu 23 verschiedene Proteine [7]. Diese lassen sich in sieben Untergruppen, mit den vier bekanntesten Vertretern Rac1, RhoA, CDC42 und RhoH, unterteilen (Abbildung 2).

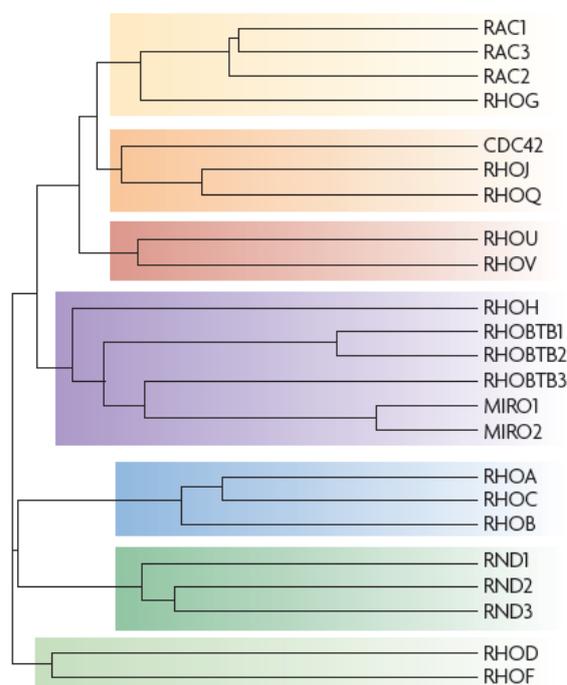


Abbildung 2: Murine Rho-GTPasen. Dargestellt ist der phylogenetische Stammbaum der 23 murinen Rho-GTPasen. Dieser kann in 7 Untergruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe besteht aus Rac1, Rac2, Rac3 und RhoG; die zweite Gruppe aus CDC42, RhoJ und RhoQ; die dritte Gruppe aus RhoU und RhoV; die vierte Gruppe aus RhoH, RhoBTB1-3 und Miro1-2; die fünfte Gruppe aus RhoA, RhoB und RhoC; die sechste Gruppe aus Rnd1-3 und die siebte Gruppe besteht aus RhoD und RhoF. Dabei sei erwähnt, dass die Zugehörigkeit von RhoBTB3 sowie Miro1 und Miro2 zu der Familie der Rho-GTPasen kontrovers diskutiert wird (Tybulewicz et al., Nature Reviews, 2009).

Die Hauptfunktion der Rho-GTPasen besteht in der Regulation des Aktinzytoskeletts. Eine Aktivierung von RhoA führt beispielsweise zur Ausbildung so genannter Stressfasern. Rac hingegen induziert die Bildung flacher, breiter Zellfortsätze, die als Lamellipodien bezeichnet werden. CDC42-Aktivierung führt wiederum zur Ausbildung fadenförmiger Zellausstülpungen, den Filopodien [2]. Somit fungieren Rho-Proteine als molekulare Schalter, die extrazelluläre Signale an das Zytoskelett weiterleiten und so zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Migration und Phagozytose regulieren. Die Zellmigration scheint dabei vorwiegend von den beiden GTPasen Rac und RhoA kontrolliert zu werden. Während Rac Membran-Ausstülpungen an der Front des Leitsaums induziert, reguliert RhoA die

Kontraktilität des Zellkörpers [5]. RhoA spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Komplementrezeptor-vermittelten Phagozytose. Die Immunglobulinrezeptor-induzierte Phagozytose wird dagegen durch CDC42 und Rac kontrolliert [3, 4, 8, 9]. Neben der Regulation des Zytoskeletts spielen Rho-Proteine eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion. CDC42 und Rac1 sind beispielsweise an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 beteiligt. Außerdem wurde gezeigt, dass RhoA, CDC42 und Rac1 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B beeinflussen [10].

2.2.2 Aktivierung der Rho-GTPasen

Rho-Proteine sind molekulare Schalter, welche zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand hin und her wechseln (Abbildung 3).

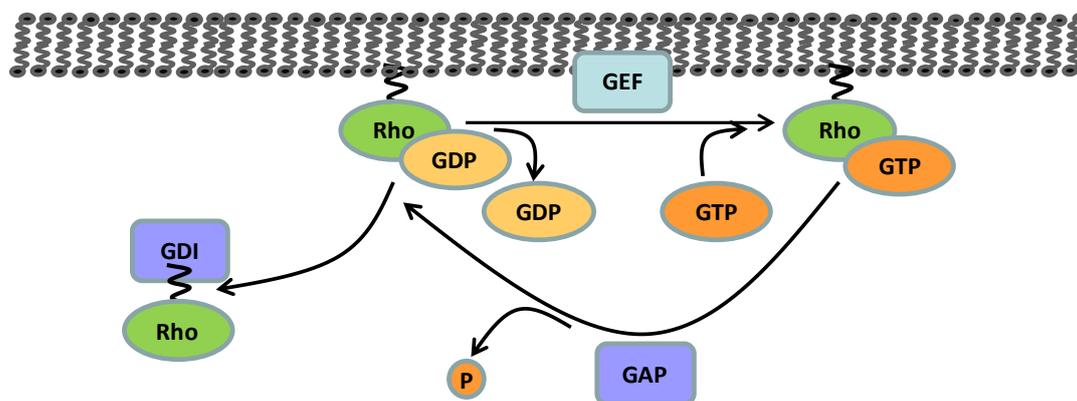


Abbildung 3: Regulation der Rho-GTPase Aktivität. Dargestellt ist eine Rho-GTPase, die über einen Isoprenylrest in der Plasmamembran verankert ist. Membranständige GEFs katalysieren den Austausch von GDP zu GTP und aktivieren somit die Rho-GTPase. GAPs hingegen inaktivieren die Rho-GTPase indem sie GTP zu GDP und P_i hydrolysieren. GDIs bewahren den inaktiven, GDP-gebundenen Zustand der Rho-Proteine indem sie ein Anheften an die Plasmamembran und somit eine Aktivierung durch GEFs verhindern (Modifiziert nach Tybulewicz et al.; Nature Reviews, 2009).

Die Aktivität der Rho-GTPasen wird von drei unterschiedlichen Proteinfamilien kontrolliert, den GEFs (guanine nucleotide exchange factors), den GAPs (GTPase-activating proteins) und den GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors). GEFs aktivieren Rho-GTPasen indem sie den Austausch von GDP zu GTP katalysieren. GAPs und GDIs hingegen fungieren als Inhibitoren, indem sie die intrinsische GTPase-Aktivität der Rho-Proteine aktivieren (GAPs) oder eine Bindung an die Plasmamembran verhindern (GDIs) [7].

2.2.3 Struktur der Rho-GTPasen

Alle Rho-Proteine besitzen eine konservierte Phosphatbindedomäne, die für die GTPase-Aktivität der Rho-Proteine verantwortlich ist. Durch den Austausch von GDP und GTP kommt es zu einer Konformationsänderung in zwei benachbarten Domänen, die als Switch I und Switch II Region bezeichnet werden. Besonders wichtig für die intrinsische GTPase-Aktivität der Rho-Proteine ist ein konservierter Glyzin-Rest in der Phosphatbindedomäne (G12) und ein Glutamin-Rests (Q61) in der Switch II Region [11]. Beide Aminosäuren fehlen bei RhoH, wobei G12 durch einen Serin-Rest und Q61 durch einen Asparagin-Rest ersetzt wurde. Somit gehört RhoH zu den wenigen konstitutiv aktiven Rho-Proteinen (Abbildung 4).

	Phosphate Binding loop	Switch I	
Rac1	-MQAI--KCVVVG DG AVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPVNLGLWD		57
Cdc42	-MQTI--KCVVVG DG AVGKTCLLISYTTNKFSEYVPTVFDNYAVTMIGGEPYTLGLFD		57
RhoA	-MAAIRKKLVIVG DG ACGKTCLLIVFSKDQFPVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWD		59
RhoH	MLSSI--KCVLVG DS AVGKTSLLVRFSTETFPPEAYKPTVYENTGVDFVMDGIQISLGLWD		58
	Switch II		
Rac1	TAG Q EDYDRLRPLSYPQTDVFLICFSLVSPASFENVRAKWYPEVRHHCP-NTPIILVGTK		116
Cdc42	TAG Q EDYDRLRPLSYPQTDVFLVCFVSVSPSSFENVKEKWVPEITHHCP-KTPFLLVGTQ		116
RhoA	TAG Q EDYDRLRPLSYPDTDVILMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFCP-NVPIILVGNK		118
RhoH	TAG N DAFRSIRPLSY QQAD VVLMCY SVAN HNSFLNLKKNWIGEIRSNLP-CTPVLVVATQ		117
	ITAM-like		
	Rho specific insert		
Rac1	LDLRD DKDTIEKLKEK LTPITYPQGLAMAKEIGAVKYLECSALTQRGLKTVFDEAIRAV		176
Cdc42	IDLRD DPSTIEKLAKNK QKPITPETAEKLARDLKAVKYVECSALTQRGLKNVFDEAILAA		176
RhoA	KDLRN DEHTRRELAKM QEPVKPEEGRDMANRIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAA		178
RhoH	TDQR----- EMGP HRA SCV NAMEGKKLAQDVRAGYLECSALSNRGVQVFECAVRTA		170
Rac1	LCPPPV KKR ----- KRK CLLL		192
Cdc42	LEPPETQP----- KRK CCIF		191
RhoA	LQARR GKK ----- KSG CLVL		193
RhoH	VNQARRR RRR LFSINE CK IF		191

Abbildung 4: Proteinstruktur der vier bekanntesten Rho-GTPasen (Rac1, RhoA, CDC42 und RhoH). Die für die intrinsische GTPase-Aktivität verantwortlichen Domänen (Phosphatbindedomäne, Switch 1 und Switch II Region) sind grau hinterlegt. Konservierte sowie RhoH-spezifische Aminosäuren sind in rot dargestellt. Außerdem ist das RhoH-spezifische ITAM-ähnliche Motiv markiert (Fueller et al., Cell Communication and Signaling, 2008).

Neben den enzymatischen Domänen besitzen Rho-Proteine außerdem eine Rho-spezifische Sequenz von 13 bzw. 7 Aminosäuren, über die sie an Effektormoleküle binden können. Das C-terminale Ende der Rho-GTPasen besteht aus einem CaaX-Motif mit einem konservierten Zystein-Rest. Dieser Zystein-Rest kann posttranslational durch Isoprenylierung modifiziert werden, wodurch eine Interaktion mit der Plasmamembran ermöglicht wird [11].

2.3 Besonderheiten der atypischen Rho-GTPase RhoH

RhoH wurde ursprünglich als ein LAZ3/BCL6 Translokationspartner in der non-Hodgkin Lymphom-Zelllinie VAL entdeckt und als „translation three four“ (TTF) bezeichnet [12]. Weitere Untersuchungen identifizierten RhoH als eine kleine GTPase, bestehend aus 191 Aminosäuren. Mit einer Sequenzhomologie von 45% konnte RhoH den Rho-GTPasen zugeordnet werden [11]. RhoH unterscheidet sich jedoch in vielerlei Hinsicht von anderen Rho-Proteinen und wird deshalb häufig als atypische Rho-GTPase bezeichnet. So wurde zum Beispiel eine Verkürzung der Rho-spezifischen Sequenz von 13 auf 7 Aminosäuren bei RhoH festgestellt. Ein Austausch konservierter Aminosäuren in der Phosphatbindedomäne und der Switch II Region führen außerdem zum Verlust der intrinsischen GTPase-Aktivität, wodurch RhoH konstitutiv aktiviert bleibt [11]. Des Weiteren scheint RhoH ausschließlich von hämatopoetischen Zellen exprimiert zu werden. Während RhoH in verschiedenen murinen und humanen Immunzellen wie T-Zellen, B-Zellen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten nachgewiesen wurde, konnte RhoH in keinem der Organe außerhalb des Immunsystems wie Leber, Herz, Niere, Gehirn und den Geschlechtsorganen gefunden werden [13-15]. Auch in seiner Funktion unterscheidet sich RhoH sehr stark von den meisten Rho-Proteinen. Ebenso wie RhoB, RhoD und RhoE/Rnd3 wird RhoH eine antagonistische Wirkung zu anderen Rho-GTPasen zugesprochen. So wurde eine Hemmung der RhoA- und Rac1-induzierten NF κ B-Aktivierung durch RhoH beschrieben [16]. Außerdem scheint RhoH einen negativen Einfluss auf Rac1-vermittelte Migrationsprozesse zu haben. So konnte eine verstärkte Rac1 Aktivierung und erhöhte Chemotaxis in RhoH-defizienten, hämatopoetischen Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Zudem wurde gezeigt, dass eine Verankerung von Rac1 in der Plasmamembran, welche Voraussetzung für SDF1- α -induzierte Aktinpolymerisation und Migration ist, durch RhoH blockiert wird [13, 17]. Es gibt jedoch auch viele Signalwege, die durch RhoH positiv beeinflusst werden, wie zum Beispiel die Immunrezeptor-vermittelten Signalkaskaden von B-Zellen, T-Zellen und Mastzellen. In T-Zellen fungiert RhoH als eine Art Transportprotein, welches die Tyrosinkinase Zap70 an den T-Zell Rezeptorkomplex (TCR) transportiert und anschließend aktiviert. Dabei bindet RhoH über sein ITAM-ähnliches Motiv an Zap70. Auf Grund der eingeschränkten TCR-Signaltransduktion haben RhoH-defiziente Mäuse einen Defekt in der Thymozytenselektion und weisen einen Mangel an T-Zellen auf [18-20]. Während Zap70 eine zentrale Rolle in der TCR-Signaltransduktion spielt, nutzen B-Zellen und Mastzellen die Tyrosinkinase Syk zur Signalweiterleitung nach B-Zell Rezeptor (BCR)- bzw. Fc ϵ RI-Stimulation. Analog zur Zap70-Aktivierung in T-Zellen wurde gezeigt, dass auch die Syk-Aktivierung in B-Zellen und

Mastzellen RhoH-abhängig verläuft [21, 22]. So wurde neben einer Hemmung der FcεRI-vermittelten Syk-Phosphorylierung eine verminderte Degranulation und Zytokin-Produktion nach FcεRI-Stimulation in RhoH-defizienten Mäusen beobachtet [22]. Da RhoH konstitutiv aktiv ist, scheint es wahrscheinlich, dass die Expression streng reguliert wird, um selektive Funktionen zu ermöglichen. In neutrophilen Granulozyten wurde beispielsweise eine Induktion der RhoH-Expression nach GM-CSF-Stimulation beobachtet [23]. Auf diese Weise scheint ein negativer Rückkopplungsmechanismus der Leukotrien B₄ Produktion induziert zu werden. Dagegen wurde eine Abnahme der RhoH-Expression in T-Zellen nach PMA- bzw. TCR-Stimulation beobachtet [14, 16]. Welche Transkriptionsfaktoren die RhoH-Expression regulieren, ist jedoch unklar. Wie bereits erwähnt, wurde RhoH zum ersten Mal als ein LAZ3/BCL6 Translokationspartner in einer non-Hodgkin Lymphom-Zelllinie entdeckt. Daraufhin wurden Genumlagerungen, die zu einem Austausch des RhoH-Promoters mit dem LAZ3-Promoter und somit zu einer veränderten Expression führen, auch bei Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen gefunden [12]. Wie bei diffusen großzelligen B-Zelllymphomen gezeigt, treten neben chromosomalen Translokationen außerdem Hypermutationen im 5' nicht-translatierten Bereich des RhoH-Gens auf [24]. Dies ist ein potentiell regulatorischer Bereich, der durch unterschiedliche Spleiß-Varianten in den einzelnen Zelltypen sehr heterogen ist [15]. Eine Veränderung in der RhoH-Expression wurde außerdem bei der Haarzelleukämie und der akuten myeloiden Leukämie festgestellt. In beiden Fällen konnte eine Verminderte RhoH-Expression mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht werden [25, 26]. Diese Erkenntnisse liefern mögliche neuartige Angriffspunkte in der hämatologischen Krebstherapie.

2.4 Die angeborene Immunantwort

Mechanische Barrieren wie die Haut, antimikrobielle Substanzen und die physiologische Bakterienflora verhindern in der Regel ein Eindringen von Mikroorganismen in den Körper. Gelingt es einem Erreger trotzdem diese erste Hürde des angeborenen Immunsystems zu überwinden, so wird er meist noch an der Eintrittspforte durch Phagozyten wie zum Beispiel Makrophagen beseitigt. Phagozyten sind somit ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie verhindern, dass Pathogene in die Blutgefäße vordringen und sich über das Gefäßsystem im Körper ausbreiten. Makrophagen spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von Mikroorganismen. Sie besitzen außerdem ein breites Spektrum an Immunrezeptoren, wie zum Beispiel Toll-like Rezeptoren, mit denen sie pathogene Strukturen erkennen [27]. Über die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren setzen Makrophagen eine Reihe an Zytokinen frei, die wiederum andere Immunzellen an den Entzündungsherd locken.

Außerdem spielen Makrophagen eine zentrale Rolle bei der Einleitung einer adaptiven Immunantwort. Sie präsentieren phagozytiertes Material über MHC-II Moleküle an T-Zellen, was zu einer Aktivierung dieser Zellen führt.

2.4.1 Toll-like Rezeptoren

Toll Rezeptoren wurden ursprünglich in *Drosophila* Embryonen entdeckt, wo sie die Ausbildung einer dorso-ventralen Achse induzieren [28, 29]. Später fand man heraus, dass Toll Rezeptoren neben der Embryonalentwicklung auch die angeborene Immunabwehr erwachsener Tiere kontrollieren [30]. Das humane Analogon zum Toll-Protein ist der Toll-like Rezeptor (TLR) [31]. Toll-like Rezeptoren bestehen aus einer Leucin-reichen extrazellulären Domäne (LRR) und einer, für die Signalweiterleitung wichtigen, zytoplasmatischen Domäne. Da Toll-like und IL-1 Rezeptoren (IL-1R) die gleiche zytoplasmatische Domäne aufweisen, wird diese auch als Toll/IL-1 Rezeptor-Domäne (TIR-Domäne) bezeichnet (Abbildung 5).

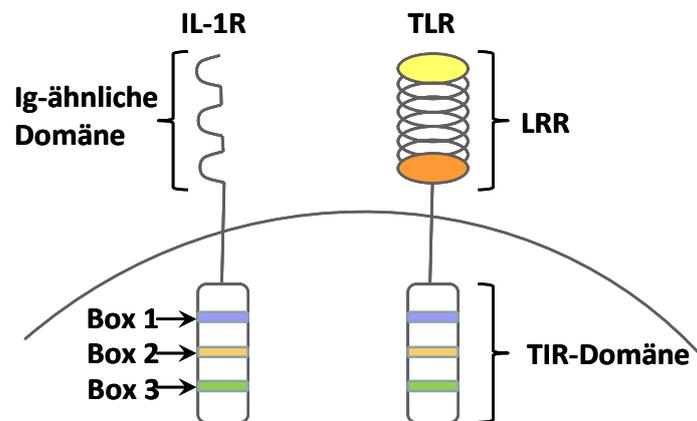


Abbildung 5: Toll-like und IL-1 Rezeptor im Vergleich. Im Gegensatz zur extrazellulären Domäne des IL-1 Rezeptors, die aus Immunglobulin-ähnlichen Strukturen aufgebaut ist, besteht die extrazelluläre Domäne des Toll-like Rezeptors aus Leucin-reichen Verbindungen (LRR). Die intrazelluläre TIR-Domäne hingegen, ist bei beiden Rezeptoren gleich und unterteilt sich in die Bereiche Box 1, Box 2 und Box 3 (Modifiziert nach Krishnan et al., *Experimental and Molecular Medicine*, 2007).

Die TIR-Domäne ist insgesamt 160 Aminosäuren lang und spielt eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion der Toll-like und IL-1 Rezeptoren. Sie besteht aus drei Abschnitten (Box 1-3), wobei Box 2 sowohl für die Interaktion mit Signalmolekülen als auch für die Dimerisierung der Toll-like Rezeptoren verantwortlich ist [32]. Die Ektodomänen der Toll-like Rezeptoren weisen eine hufeisenartige Struktur auf, welche nach Dimerisierung eine M-Form bilden [33-35]. Es sind bisher 10 verschiedene humane (TLR-1 - TLR-10) und 12

murine (TLR-1 – TLR-9 und TLR-11 – TLR-13) Toll-like Rezeptoren bekannt, die jeweils unterschiedliche pathogene Strukturen erkennen [32, 36]. Dabei handelt es sich um sogenannte konservierte Strukturen (PAMPs = pathogen associated molecular patterns), die auf einer Vielzahl von Erregern zu finden sind. So werden beispielsweise Lipoproteine und Peptidoglykan, das in der Zellwand Gram-positiver Bakterien vorkommt, sowie Zymosan, ein Bestandteil der Zellwand von Hefen, über ein Heterodimer aus TLR-2 und TLR-1 bzw. TLR-2 und TLR-6 erkannt [37-39]. Lipopolysaccharide (LPS) Gram-negativer Bakterien werden dagegen von einem Rezeptorkomplex, bestehend aus einem TLR-4-Homodimer, einem CD14- und einem MD-2-Molekül, erkannt. Während TLR-4 und MD-2 für die Bindung des LPS-Moleküls verantwortlich sind, induziert CD14 eine Internalisierung des LPS-gebundenen Rezeptorkomplexes. MD-2 unterstützt außerdem den Transport von neu synthetisiertem TLR-4 an die Zelloberfläche [40-43]. Des Weiteren wird Flagellin durch TLR-5, virale doppelsträngige RNA durch TLR-3, virale einzelsträngige RNA durch TLR-7/8 und bakterielle CpG-reiche DNA durch TLR-9 erkannt [44-46]. Toll-like Rezeptoren können auf Grund ihrer Lokalisation in zwei Gruppen eingeteilt werden. TLR-1 – TLR-2 und TLR-4 – TLR-6 erkennen extrazelluläre Strukturen und sind deshalb auf der Zelloberfläche zu finden. TLR-3 und TLR-7 – TLR-9 werden dagegen endosomal exprimiert. Dort binden sie an intrazelluläre Moleküle wie virale RNA und bakterielle DNA, die von Pathogenen in der Wirtszelle freigesetzt werden [44, 47].

2.4.2 Signaltransduktion durch Toll-like Rezeptoren

Die Signaltransduktion der Toll-like Rezeptoren erfolgt entweder über die Adapter-Moleküle TRIF (TIR domain-containing adapter inducing interferon- β), TRIF und TRAM (TRIF related adapter molecule), MyD88 (myeloid differentiation factor 88) oder MyD88 und TIRAP/Mal (MyD88-adapter-like). Bis auf TLR-3 nutzen alle Toll-like Rezeptoren MyD88 als Adapter-Molekül (Abbildung 6). Für die Signaltransduktion von TLR-1, TLR-2, TLR-4 und TLR-6 wird neben MyD88 noch ein weiterer Adapter (TIRAP/Mal) benötigt. TLR-3 hingegen leitet Signale ausschließlich über TRIF weiter. Der einzige Rezeptor der beide Rezeptorkombinationen (MyD88 und TIRAP/Mal bzw. TRIF und TRAM) zur Signalweiterleitung nutzen kann ist TLR-4. Dazu muss der Rezeptor jedoch internalisiert werden [48-53]. Nach erfolgter Liganden-Bindung wird eine Signalkaskade eingeleitet, die in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, IRF3 und IRF7 endet. Je nachdem welche Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, kommt es zu einer Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen oder Typ I Interferonen (IFN- α und IFN- β).

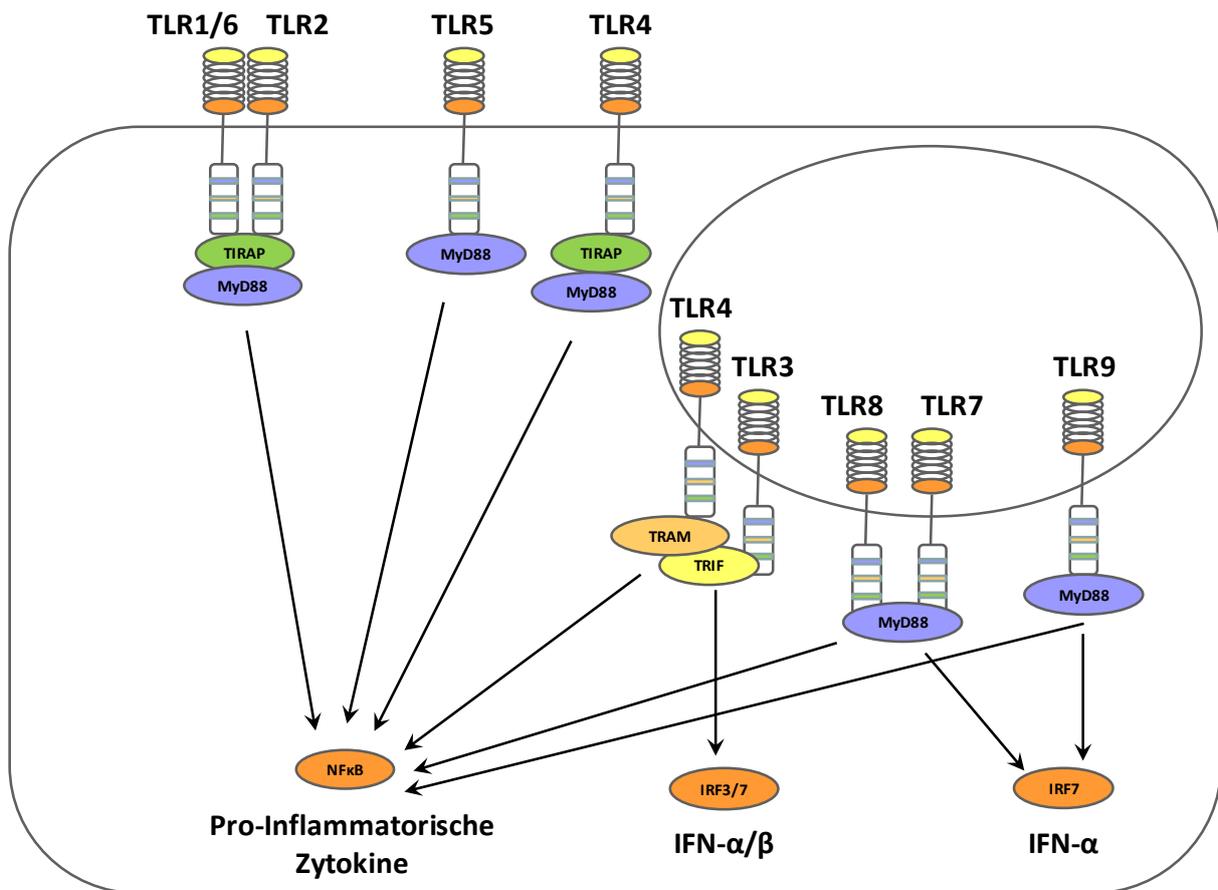


Abbildung 6: Signaltransduktion der Toll-like Rezeptoren. Die Signaltransduktion der Toll-like Rezeptoren erfolgt entweder über MyD88 (TLR-5 und TLR-7 – TLR-9), TIRAP und MyD88 (TLR-1, TLR-2, TLR-4 und TLR-6), TRIF (TLR-3) oder TRIF und TRAM (TLR-4). TLR-induzierte Signalkaskaden führen zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NFκB, IRF3 und IRF7, die wiederum die Expression pro-inflammatorischer Zytokine sowie Typ I Interferone (IFN-α und IFN-β) regulieren (Modifiziert nach Krishnan et al., *Experimental and Molecular Medicine*, 2007).

Die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine kann durch alle Toll-like Rezeptoren hervorgerufen werden. Typ I Interferone können dagegen nur durch intrazelluläre Toll-like Rezeptoren sowie TLR-4 induziert werden. Dabei führen TLR-3- und TLR-4-vermittelte Signalkaskaden zu einer Produktion von IFN-α und IFN-β, während über TLR-7, TLR-8 und TLR-9 nur IFN-α produziert wird [44].

Die Signalwege, die zu einer Aktivierung von NFκB führen, können noch weiter in einen klassischen und einen alternativen Weg unterteilt werden, wobei alle Toll-like Rezeptoren den klassischen Weg zur Signalweiterleitung nutzen [54]. Beim klassischen Weg wird die NFκB-Untereinheit p50 kontinuierlich vom Proteasom aus p105 hergestellt. Prozessiertes p50 bildet Heterodimere mit den NFκB-Untereinheiten RelA, RelB oder c-Rel aus. Diese Heterodimere gehen im Zytoplasma Komplexe mit IκBα ein, welches einen Kerntransport verhindert. Erst

nach TLR-Stimulation kommt es zu einer Aktivierung der Kinasen IKK α , IKK β und IKK γ , die I κ B α phosphorylieren. Da phosphoryliertes I κ B α abgebaut wird, kann NF κ B nun ungehindert den Zellkern passieren. Der alternative Weg wird durch CD40, den Lymphotoxin- β und den BAFF Rezeptor aktiviert und läuft über die NF κ B-Untereinheit p52. Diese wird erst nach Stimulation aus p100 hergestellt [54].

2.4.3 Toll-like Rezeptoren als Modulatoren der Mastzellfunktion

Mastzellen spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung von allergischen Reaktionen. Nach dem ersten Allergenkontakt kommt es zu einer Sensibilisierung der Mastzellen. Dabei bilden B-Zellen allergen-spezifische IgE-Antikörper, die an hoch-affine Fc ϵ Rezeptoren der Mastzellen binden. Jeder weitere Allergenkontakt führt nun zu einer sofortigen Degranulation der Mastzellen. Die in den Granula enthaltenen Mediatoren (Histamin, Zytokine, Chemokine, Proteasen und Heparin) rufen die, für eine Allergie charakteristischen Symptome wie Hautrötung, Juckreiz, Schleimhautschwellung und Schnupfen hervor [55]. Die physiologische Funktion von Fc ϵ Rezeptor-vermittelten Prozessen besteht jedoch in der Bekämpfung parasitärer Erkrankungen. Parasiten sind zu groß um von Immunzellen durch Phagozytose beseitigt zu werden. Die Granula von Mastzellen enthalten dagegen Substanzen, die für die Parasiten toxisch sind. Diese werden von sensibilisierten Mastzellen nach Antigenkontakt freigesetzt [56-58]. Des Weiteren sind Mastzellen an der Wundheilung beteiligt und tragen zur Gewebeintegrität bei [59]. Obwohl Mastzellen lange Zeit ausschließlich als Effektorzellen der adaptiven Immunabwehr betrachtet wurden, gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass sie außerdem eine Rolle in angeborenen Immunprozessen spielen. Da Mastzellen vor allem im interstitiellen Bindegewebe und in der Submucosa von Darm und Atemwegen zu finden sind, wo sie in ständigem Kontakt mit der Außenwelt stehen, ist es sehr wahrscheinlich dass sie maßgeblich an der Einleitung einer Immunantwort beteiligt sind. Evolutionär stammen Mastzellen vermutlich von einer Leukozyten-Vorläuferzelle ab, deren Funktion in der Beseitigung Körper-eigener und Körper-fremder Moleküle, sowie der Freisetzung zytotoxischer Substanzen bestand. Dieser Vorläuferzelle verdanken Mastzellen wahrscheinlich auch ihre Fähigkeit zur Phagozytose und zur Expression von Toll-like Rezeptoren [59]. Mastzellen besitzen ein breites Spektrum an Toll-like Rezeptoren, wobei es Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies gibt. Während TLR-5 und TLR-8 bis jetzt nur in Mastzellen der Ratte nachgewiesen wurden, konnten TLR-1 – TLR-4, TLR-6, TLR-7 und TLR-9 auch in diversen murinen und humanen Mastzelllinien sowie primären Mastzellen gefunden werden [60-70]. Nach Stimulation von Toll-like Rezeptoren setzen Mastzellen eine Reihe von Th2-assoziierten (IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13) sowie pro-inflammatorischen (TNF,

IL-1 β) Zytokinen frei [64, 65, 71-73]. Wie in einem Mastzell-abhängigen Modell für akute Sepsis gezeigt wurde, spielen TLR-vermittelte Signalkaskaden von Mastzellen eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten [71]. Besonders die Mastzell-abhängige IL-6-Produktion scheint dabei maßgeblich an einer Überwindung der Sepsis beteiligt zu sein [74]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass TLR-vermittelte Signalkaskaden in Mastzellen die Signaltransduktion von Fc ϵ Rezeptoren beeinflussen. So führte eine gleichzeitige Stimulation von Fc ϵ Rezeptor und TLR-2 bzw. TLR-4 zu einer verstärkten Produktion pro-inflammatorischer und Th2-assoziiertes Zytokine [72, 75, 76]. Eine Voraktivierung von TLR-2 hingegen unterdrückte die Fc ϵ Rezeptor induzierte Zytokin-Produktion und Degranulation [77]. Letztere Beobachtungen führten zu Mutmaßungen über suppressive Funktionen kommensaler Bakterien sowie oral verabreichter Probiotika in Bezug auf allergische Reaktionen. Unterstützt wird diese Hypothese durch Studien die zeigen, dass hohe Dosen an nicht-pathogenen, kommensalen *Escherichia coli* Stämmen die Degranulation muriner Mastzellen hemmen [78].

3 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte die Funktion von RhoH im TLR-Signalweg untersucht werden. Nach erfolgter Liganden-Bindung setzen Toll-like Rezeptoren eine Signalkaskade in Gang, die zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB führt. Da RhoH diverse NFκB-abhängige Prozesse beeinflusst ist es sehr wahrscheinlich, dass auch der TLR-Signalweg einer solchen Regulation unterliegt. Zu Beginn dieser Arbeit sollten TLR-abhängige Prozesse RhoH-defizienter Mastzellen analysiert werden. Dabei sollte geklärt werden ob RhoH den TLR-Signalweg auf ähnliche Weise beeinflusst wie FcεRI-vermittelte Signalprozesse. Da die Funktion von Mastzellen in der TLR-induzierten Einleitung einer Immunantwort umstritten ist sollte im Vergleich der TLR-Signalweg von Makrophagen untersucht werden. Zuvor musste jedoch geklärt werden ob RhoH überhaupt von Makrophagen exprimiert wird.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte

Agarosegel-Elektrophoresesystem	PerfectBlue™ Mini M, Peqlab, Erlangen
Blot-Kammer	Fastblot B44, Biometra GmbH, Göttingen
Brutschrank	Heracell 240i CO ₂ , Thermo Scientific, Langenselbold
Durchflusszytometer	BD FACSCanto™, BD Biosciences, Heidelberg
Geldokumentationssysteme	1. Chemi-Smart 5000, Peqlab, Erlangen 2. Infinity Video-Dokumentationssystem, Modell 3000, Peqlab, Erlangen
Mikroskope	1. Inversmikroskop, Axiovert 25 CFL, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena 2. Auflichtmikroskop, Leica DMLS, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrotiterplatten-Photometer	SUNRISE Absorbance reader, Tecan, Salzburg, Österreich
Netzgerät	Standard Power Pack P25, Biometra GmbH, Göttingen
Plattenluminometer	LUMIstar OPTIMA, BMG LABTECH GmbH, Offenburg
Schüttler	1. Thermomixer Compact, Eppendorf AG, Hamburg 2. MS 1 Minishaker (Vortexer), IKA® Works Inc., Wilmington, USA 3. Titramax 100, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
SDS-PAGE-System	XCell SureLock™ Electrophoresis cell, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Thermocycler	1. quantitative RT-PCR: 7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Darmstadt 2. Primus 25 advanced® Peqlab, Erlangen 3. Primus 96 advanced® Gradient, Peqlab, Erlangen
Ultraschall-Homogenisator	SONOPULS, UW 3100, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin

UV/Vis-Spektralphotometer	NanoDrop [®] ND-1000, Peqlab, Erlangen
UV-Leuchttisch	ECX-26M, Peqlab, Erlangen
Zentrifugen	1. Multifuge 3 S-R, Heraeus Instruments, Hanau 2. Biofuge pico, Heraeus Instrument, Hanau 3. Kühlzentrifuge 1K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz

4.2 Verbrauchsmaterial

Blotting-Papier	Whatman [®] Schleicher & Schuell GB003, Whatman GmbH, Dassel
ELISA-Platten	Microplatte, 96-well, Half-Area, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
FACS-Röhrchen	BD Falcon [™] 5 ml Rundboden-Röhrchen (Polystyrol), BD Biosciences, Heidelberg
Kanülen	Microlance [™] 3, 27G, 0,4 x 19 mm, BD Biosciences, Heidelberg
Lumineszenz-Platten	Lumitrac [™] 200, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PCR-Platten	Thermo-Fast [®] Detection Plate, ABgene House, Epsom, UK
PCR-Platten Abdeckfolie	Absolute QPCR Seal, ABgene House, Epsom, UK
Pipettenspitzen	TipTower Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl), Steinbrenner Laborsysteme GmbH, Wiesenbach
Spritzen	BD Discardit [™] II, 10 ml, BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter	Millex [®] -GS 0,22 µm, Millipore, Billerica, USA
Transfer-Membran	Protran [®] Nitrocellulose-Membran, Whatman GmbH, Dassel
Zellkulturflaschen	Cellstar [®] 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² , PS, steril, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten	Cellstar [®] 6-, 12-, 24-, 96-well, steril, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen	1. Nunclon [™] surface 144 x 21 mm, Nunc

	GmbH & Co. KG, Langenselbold
	2. Petrischalen 145 x 20 mm, steril, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
	3. Zellkulturschale 94 x 16 mm, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber	Disposable Cell Scraper, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

4.3 Chemikalien

Aqua ad injectabilia	10 ml, Braun, Melsungen
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
D-Glucose	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dithiothreitol (DDT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM, Biochrom AG, Berlin
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedel-de Haën AG, Seelze
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FACSClean™	BD Biosciences, Heidelberg
FACSFlow™	BD Biosciences, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Geneticindisulfat (G418)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hepes	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Riedel-de Haën AG, Seelze
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrigenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
4-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid	AppliChem GmbH, Darmstadt
NP-40 (Igepal CA-630)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Biochrom AG, Berlin
PBS (für die Zellkultur)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Rinderserumalbumin (BSA)	1. Für die Zellkultur: Albumin Fraktion V (10% in DPBS), Sigma-Aldrich, Taufkirchen 2. Für WB: Albumin Fraktion V, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
Tri-Calciumdicitrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
TRIS	AppliChem GmbH, Darmstadt
TRIS-Dihydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt
TRIS-HCl	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
WB-Stripping-Buffer	Restore TM , Thermo Scientific, Langenselbold

4.4 Puffer und Stocklösungen

4.4.1 Puffer

ELISA-Blockpuffer

	Endkonzentration
PBS	1 x
FCS	10%

ELISA-Coating-Buffer (pH 9,5)

	Endkonzentration
NaHCO ₃	8,4 g/l
Na ₂ CO ₃	3,56 g/l

ELISA-Coating-Buffer (pH 6,5)

	Endkonzentration
Na ₂ HPO ₄	11,8 g/l
NaH ₂ PO ₄	16,1 g/l

ELISA-PBS (10 x, pH 6,8)

	Endkonzentration
NaCl	80 g/l
Na ₂ HPO ₄	11,6 g/l
KH ₂ PO ₄	2 g/l
KCl	2 g/l

ELISA-Waschpuffer

	Endkonzentration
PBS	1 x
Tween-20	0,05%

Luziferase-Lysepuffer

	Endkonzentration
TRIS-Dihydrogenphosphat	25 mM (pH 7,8)
DTT	2 mM
CDTA	2 mM
Glycerin	10%
Triton X-100	1%

NP-40-Lysepuffer

	Endkonzentration
NP-40	1%
NaCl	150 mM
TRIS	20 mM (pH 7,4)
NaF	10 mM
EDTA	1 mM
MgCl ₂	1 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
Glycerin	10%

TAE (50 x, pH 8,3)

	Endkonzentration
TRIS	2 M
Eisessig	2 M
EDTA	0,05 M

TBS (10 x)

	Endkonzentration
TRIS-HCl	100 mM (pH 8)
NaCl	1,5 M

TNE

	Endkonzentration
TRIS	10 mM (pH 8)
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM

Tryode-Puffer

	Endkonzentration
Hepes	10 mM (pH 7,4)
NaCl	130 mM
KCl	5 mM
CaCl ₂	1,4 mM
MgCl ₂	1 mM
Glucose	5,6 mM
BSA	0,1%

WB-Blotpuffer

	Endkonzentration
TRIS	25 mM
Glycin	192 mM
Na ₃ VO ₄	0,5 mM
Methanol	20%
SDS	0,1%

WB-Laufpuffer (10 x)

	Endkonzentration
TRIS	0,25 M
Glycin	1,92 M
	pH 8,25
SDS	1%

WB-Probenpuffer (4 x SDS)

	Endkonzentration
TRIS	200 mM
SDS	8%
Glycerol	40%
β-Mercaptoethanol	400 mM

WB-Waschpuffer (TBST)

	Endkonzentration
TBS	1 x
Tween-20	0,1%

WB-Blockpuffer

	Endkonzentration
TBS	1 x
Tween-20	0,1%
BSA	5%

4.4.2 Stocklösungen

EDTA	0,5 M (pH 8)
SDS	20%
TRIS	0,5 M (pH 6,8)

4.5 Mäuse

4.5.1 Genotypisierung von Mäusen der RhoH^{-/-} Zucht

RhoH-defiziente Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Cord Brakebusch (Department of Biomedical Sciences, Universität Kopenhagen, Dänemark) zur Verfügung gestellt. Für Versuche wurden 5-25 Wochen alte Tiere, die unter keimfreien Bedingungen gehalten wurden, verwendet. Die Mäuse wurden in Polykarbonkäfigen des Typs II, auf staubfreiem Weichholzgranulat, bei einer Raumtemperatur von $22 \pm 2^\circ\text{C}$, einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5\%$ und einer Belichtungszeit von 7.00 bis 19.00 MEZ, gehalten. Es fand eine kontinuierliche Fütterung mit pelletierter, autoklavierter Alleindiät und sterilem Leitungswasser über Tränkflaschen statt. Die Tierhaltung erfolgte hinter Infektionsbarrieren. Es wurden monatliche Kontrollen auf das Freisein von Erregern, entsprechend der Liste GV-SOLAS 1995, durchgeführt. Genehmigungen zur Tötung von Mäusen und Organentnahme lagen vor. Die Experimente wurden ordnungsgemäß aufgezeichnet und über den Tierschutzbeauftragten dem Regierungspräsidium Tübingen gemeldet. Für die Genotypisierung der Mäuse wurde im Alter von vier bis fünf Wochen eine circa 0,5 cm große Schwanzbiopsie entnommen. Aus dieser wurde unter Verwendung des „DNeasy Blood and Tissue Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift (Purification of Total DNA from Animal Tissues, Spin-Column Protocol) DNA isoliert. Zur Amplifikation des wt bzw. RhoH knock-out Gens wurde eine Touchdown-PCR (Tabelle 2) mit spezifischen Primern (Tabelle 1) durchgeführt und anschließend die DNA-Konzentration bestimmt (NanoDrop).

Tabelle 1: Sequenzen der Primer zur Amplifikation des wt bzw. RhoH^{-/-} Gens

Gen	Sequenz	Produkt (bp)
wt-RhoH	Rh1: GTG TAC GAG AAT ACG GGT GT Rh2: GTG GCC ACA ACC AGC ACC	240
RhoH ^{-/-}	Rh2: GTG GCC ACA ACC AGC ACC Rh4: CTT GTG TAG CGC CAA GTG C	325

Tabelle 2: Touchdown-PCR

Temperatur (°C)	Zeit
95	3 min
95	30 sec
62	30 sec
72	30 sec
	} 4 x
95	30 sec
60	30 sec
72	30 sec
	} 4 x
95	30 sec
58	30 sec
72	30 sec
	} 4 x
95	30 sec
56	30 sec
72	30 sec
	} 4 x
95	30 sec
54	30 sec
72	30 sec
	} 4 x
95	30 sec
52	30 sec
72	30 sec
	} 4 x
95	30 sec
50	30 sec
72	30 sec
	} 16 x
72	10 min
8	forever

Dabei wurden pro Ansatz etwa 40 ng DNA, jeweils 20 pmol des forward bzw. reverse Primers, 1 unit Taq DNA Polymerase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main), 4 nmol dNTPs (Solis BioDyne, Tartu, Estland), 40 nmol MgCl₂ (Solis BioDyne, Tartu, Estland), 2 µl 10 x Standard Taq Reaction Buffer (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) und 1 µl DMSO (AppliChem GmbH, Darmstadt) in einem Gesamtvolumen von 20 µl aufgenommen. Das gesamte PCR-Produkt wurde mit 4 µl 6 x Loading Dye (Fermentas, St.

Leon-Rot) versetzt und über ein 1,5% Agarose Gel bei 120 V aufgetrennt. Zuvor wurde die Agarose (UltraPureTM Agarose, Life Technologies GmbH, Darmstadt) durch Erhitzen in TAE-Puffer gelöst und mit 10 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Merck, Darmstadt) versehen. Die DNA wurde unter UV-Beleuchtung (Wellenlänge 254 nm) sichtbar gemacht und das Ergebnis auf einem Foto dokumentiert (Infinity Video-Dokumentationssystem, Modell 3000, Peqlab).

4.5.2 Gewinnung von Knochenmark

Zur Gewinnung von Knochenmark wurden Mäuse durch Inhalation von CO₂ getötet. Die Ober- und Unterschenkelknochen beider Vorder- und Hinterbeine wurden entnommen und von Muskelgewebe befreit. Anschließend wurden die Knochen unmittelbar neben den Gelenken abgeschnitten, so dass das Knochenmark zugänglich war. Die Knochen wurden mit Hilfe einer 10 ml Spritze und einer 27G-Kanüle mit jeweils 1,5 ml Medium (DMEM, ergänzt mit 10% FCS, 1% P/S und 50 µM β-Mercaptoethanol für die Generierung von Makrophagen bzw. RPMI, ergänzt mit 20% FCS, 1% P/S, 50 µM β-Mercaptoethanol und 2% X63Ag8-Kulturüberstand für die Generierung von Mastzellen) durchspült. Das so gewonnene Knochenmark wurde für 5 min bei 1.300 rpm zentrifugiert (Multifuge 3 S-R) und anschließend in frischem Medium aufgenommen und in Zellkulturschalen ausgebracht.

4.5.3 Generierung von Makrophagen

Zur Generierung von Makrophagen wurde das gewonnene Knochenmark in 20 ml DMEM, ergänzt mit 10% FCS, 1% P/S und 50 µM β-Mercaptoethanol, aufgenommen, in einer sterilen Petrischale (145 x 20 mm, Greiner Bio-One GmbH) ausgebracht und über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag (Tag 1) wurden die nicht-adhären Zellen geerntet (Multifuge 3 S-R, 5 min, 1.300 rpm), in frischem Medium aufgenommen, auf 4 Petrischalen verteilt (14 ml/Schale) und mit jeweils 9 ml L929-Kulturüberstand (enthält M-CSF) versetzt. Nach weiteren 48 Stunden im Brutschrank (Tag 3) wurden die Zellen erneut mit L929-Kulturüberstand versetzt (12 ml/ Schale). Sieben Tage nach der Knochenmarksentnahme waren die Makrophagen ausdifferenziert und konnten für Versuche verwendet werden. Zu diesem Zeitpunkt waren die BMMΦs in der FACS-Analyse zu etwa 98% CD11b positiv. Um die Zellen von der Schale zu lösen, wurden sie für 20 Minuten im Brutschrank mit Trypsin-EDTA (2 ml/Schale) inkubiert und anschließend mit einem Zellschaber abgeschabt.

4.5.4 Generierung von Mastzellen

Zur Generierung von Mastzellen wurde das gewonnene Knochenmark in 20 ml RPMI, ergänzt mit 20% FCS, 1% P/S, 50 μ M β -Mercaptoethanol und 2% X63Ag8-Kulturüberstand (enthält IL-3), aufgenommen und in einer Zellkulturschale (NunclonTM surface 144 x 21 mm) ausgebracht. Die Suspensionszellen wurden alle zwei bis drei Tage in neue Schalen überführt und bei Bedarf ein Medienwechsel durchgeführt. Nach etwa 4 Wochen waren die Mastzellen ausdifferenziert und konnten für Versuche verwendet werden. Zu diesem Zeitpunkt waren die BMDCs in der FACS-Analyse zu etwa 98% Fc ϵ RI- und C-Kit (CD117)-doppeltpositiv. Der Nachweis des Fc ϵ RI erfolgte indirekt über Rezeptor-gebundenes IgE. Daher wurden die Mastzellen vor der Färbung über Nacht mit IgE (anti-DNP IgE, 10 μ g/ml, SPE-7, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) vorinkubiert.

4.6 Zelllinien

4.6.1 IL-3 produzierende X63Ag8 Zellen

X63-Zellen sind Maus-Myelomzellen der Linie X63Ag8, die mit dem Gen für murines IL-3 transfiziert wurden und dieses in den Überstand sezernieren [79]. Die Zellen wurden nach dem Auftauen für 3 Tage in 10 ml RPMI, ergänzt mit 10% FCS, 0,5% P/S und 10 μ M β -Mercaptoethanol, in einer Zellkulturschale (94 x 16 mm, Greiner Bio-One GmbH) kultiviert. Danach wurden die Zellen geerntet (Multifuge 3 S-R, 5 min, 1.300 rpm), in frischem Medium aufgenommen, auf 5 Zellkulturschalen verteilt und mit G418 (1 mg/ml) selektioniert. Nach weiteren 48 Stunden (Tag 5) wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Dabei wurden die Zellen auf 15 Schalen verteilt und für weitere 48 Stunden (bis Tag 7) mit G418 selektioniert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, in G418-freies Medium aufgenommen, auf 30 Schalen verteilt und für weitere 5 Tage (bis Tag 12) im Brutschrank inkubiert. Nach 12-tägiger Inkubation wurde der zellfreie Überstand abgenommen, steril filtriert (0,2 μ m Porengröße) und bei -20°C gelagert.

4.6.2 M-CSF produzierende L929 Zellen

L929 Zellen sind adhärent wachsende Maus-Fibroblasten, die von L-Zellen abstammen und murines M-CSF in den Überstand sezernieren [80]. Es wurden jeweils 3×10^6 Zellen in 30 ml DMEM, ergänzt mit 10% FCS, 1% P/S und 50 μ M β -Mercaptoethanol, aufgenommen und in einer Zellkulturschale (NunclonTM surface 144 x 21 mm) ausgebracht. Nach 3- bis 4-tägiger Inkubation wurde der zellfreie Überstand abgenommen, steril filtriert (0,2 μ m Porengröße) und bei -20°C gelagert.

4.6.3 Raw 264.7

Raw 264.7 Zellen sind murine Makrophagen, die in DMEM, ergänzt mit 10% FCS und 1% P/S, kultiviert wurden. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage 1/10 gesplittet, indem sie mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche gelöst wurden.

4.7 Verwendete Stimuli und Inhibitoren

4.7.1 Stimuli

Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ (P3C) – TLR2 und TLR1:

P3C (Invivogen, Toulouse, Frankreich) ist ein synthetisches, triacetyliertes Lipopeptid, welches dem acetylierten Aminoterminus bakterieller Lipopeptide entspricht. Es stimuliert ein Heterodimer aus TLR2 und TLR1. P3C wurde als Stammlösung von 1 mg/ml in Aqua dest. angesetzt und aliquotiert bei -20°C gelagert.

Lipoteichonsäure (LTA) – TLR2:

Lipoteichonsäure (von *Staphylococcus aureus*, L 2515, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ist ein Bestandteil der Zellwand von Gram-positiven Bakterien und wirkt als Stimulus für TLR2/TLR6. LTA wurde als Stammlösung von 10 mg/ml in Aqua dest. angesetzt und aliquotiert bei -20°C gelagert.

Polyinosinic-polycytidylic acid (PIC) – TLR3:

PIC (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ist ein synthetisches Analogon zu dsRNA und stimuliert Zellen über TLR3. Es wurde eine Stammlösung von 1 mg/ml in Aqua dest. angesetzt und aliquotiert bei -20°C gelagert.

Lipopolysaccharid (LPS) – TLR4:

Gram-negative Bakterien besitzen als Bestandteil ihrer Zellwand Lipopolysaccharid, welches aus einem Lipid-A-Anteil und einer für den jeweiligen Bakterienstamm spezifischen Polysaccharidkette zusammengesetzt ist. Aufgereinigtes LPS stimuliert die Zellen über TLR4. LPS (von *Salmonella abortus equi*, L 5886, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde in Aqua dest. gelöst und als 1 mg/ml-Stammlösung, aliquotiert bei -20°C gelagert.

R848 – TLR7 und TLR8:

R848 ist ein synthetisches Purin-Analogon, welches TLR7 und TLR8 stimuliert. R848 wurde von Invivogen, Toulouse, Frankreich bezogen, in Aqua dest. gelöst und als 1 mg/ml-Stammlösung, aliquotiert bei -20°C gelagert.

CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG) – TLR9:

CpG (Phosphothioat-modifiziert) wurde von TIB MOLBIOL GmbH, Berlin synthetisiert, in Aqua dest. gelöst und als 250 µM-Stammlösung, aliquotiert bei -20°C gelagert.

Dinitrophenyl-konjugiertes humanes Serum-Albumin (DNP-HSA):

DNP-HSA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) dient der Vernetzung von Fcε Rezeptoren, die zuvor mit DNP-spezifischen IgE Antikörpern sensibilisiert wurden.

4.7.2 Inhibitoren**Piceatannol:**

Piceatannol (Merck, Darmstadt) ist ein zellpermeabler Pflanzen-Metabolit, der in RBL-H3 Zellen selektiv Syk inhibiert.

Bay 11-7082:

Bay 11-7082 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) inhibiert die Phosphorylierung von IκBα und somit dessen Degradation.

PP1, PP2:

PP1 (Merck, Darmstadt) ist ein Src-Kinase-Inhibitor für Lck, Fyn, Src und Hck. PP2 (Merck, Darmstadt) inhibiert dagegen nur Lck, Fyn und Hck.

4.8 Luziferase Reportergen Assay

Für den Luziferase Reportergen Assay wurden je 2×10^5 Raw 264.7 Zellen pro well in einer 24-well Platte (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH), in einem Volumen von 500 µl pro well ausgebracht und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium gewechselt (Medium ohne P/S) und die Zellen mit RhoH (PIG-RhoH, 0,1 µg/well) bzw. einer Leervektorkontrolle (PIG, 0,1 µg/well) und einem NFκB-Luziferase Reportergen (pNF-κB, 0,01 µg/well, Promega, Madison, WI, USA) transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit Metafecten (0,9 µl/well, Biontex Laboratories GmbH, Martinsried) nach Herstellervorschrift. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde ein Medienwechsel durchgeführt (Medium ohne P/S) und die Zellen über Nacht mit verschiedenen TLR-Liganden stimuliert.

Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit Luziferase-Lysepuffer (100 µl/well) auf einem Plattenschüttler für 30 min lysiert. Anschließend wurden je 40 µl Zelllysate pro well in eine Lumineszenz-Platte (LumitracTM 200, Greiner Bio-One GmbH) überführt und die Luziferase-Reportergen-Aktivität mit Hilfe des Luziferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA) an einem Plattenluminometer (LUMIstar OPTIMA, BMG LABTECH GmbH) gemessen.

4.9 Quantitative RT-PCR

Zur Genexpressionsanalyse wurde je 1×10^6 Zellen pro well in einer 6-well Platte (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH) ausgebracht, in einem Gesamtvolumen von 2 ml stimuliert und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Bei adhärennten Zellen wurde mit der Stimulation gewartet bis sich die Zellen am Boden abgesetzt hatten. Die Isolation der RNA erfolgte unter Verwendung des „High Pure RNA Isolation Kit“ (Roche, Mannheim) nach Herstellervorschrift. Aus der isolierten RNA wurde mit Hilfe des „RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Fermentas, St. Leon-Rot) und unter Verwendung von Oligo (dT)18-Primern cDNA hergestellt. Die so entstandene cDNA wurde mit Aqua ad injectabilia (B. Braun, Melsungen) 1/3 verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Aliquots der cDNA fungierten als template für die quantitative RT-PCR. Die RT-PCR wurde mittels „Absolute SYBR Green ROX Mix“ (Thermo Scientific, Langenselbold) nach Angaben des Herstellers auf dem 7900 HT Fast Real-Time PCR System (AB Applied Biosystems, Darmstadt) mit einem 96-Proben Block durchgeführt (95°C 15 min; 40x (95°C, 15 sec; 60°C, 1 min)). Dabei wurden pro Ansatz 2,5 µl der verdünnten cDNA, jeweils 6,25 pmol des forward bzw. reverse Primers (Tabelle 3) und 12,5 µl Absolute SYBR Green ROX Mix in einem Gesamtvolumen von 25 µl aufgenommen. Zur Überprüfung der Spezifität der amplifizierten Sequenz wurde für alle PCR Produkte eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Tabelle 3: Sequenzen der Primer für quantitative RT-PCR

Gen	Spezies	Sequenz	Produkt (bp)
TLR-2	Maus	fw: GCC AAG AGG AAG CCC AAG A rv: AAG GGC GGG TCA GAG TTC TC	131
TLR-4	Maus	fw: GCA GGT GGA ATT GTA TCG CC rv: TTC GAG GCT TTT CCA TCC AA	123
TLR-6	Maus	fw: CGA GCC TGA GGC ATC TAG ACC rv: GAG CAA CTG GGA GCA GAT CC	141
TLR-9	Maus	fw: GGG CCC ATT GTG ATG AAC C rv: GCT GCC ACA CTT CAC ACC AT	141
MD-2	Maus	fw: CTT TTC GAC GCT GCT TTC TC rv: CCA TGG CAC AGA ACT TCC TT	273
RhoH	Maus	fw: AGT CAT TCG CAC ACC AGT TG rv: AGA ACC CTC AAG GGC TCA AT	187
IL-6	Maus	fw: AAC GAT GAT GCA CTT GCA GA rv: CTC TGA AGG ACT CTG GCT TTG	196
TNF	Maus	fw: AGC CCC CAG TCT GTA TCC TT rv: CTC CCT TTG CAG AAC TCA GG	212
IL-12p40	Maus	fw: AAG AAG GAA AAT GGA ATT TGG TCC rv: ATG TCA CTG CCC GAG AGT CAG	184
IL-10	Maus	fw: GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA rv: ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT	191
s29	Maus	fw: AGC CGA CTC GTT CCT TTC TC rv: CGT ATT TGC GGA TCA GAC C	146

4.10 Westernblot

Es wurden jeweils 1×10^6 Zellen pro well in einer 6-well Platte (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH) ausgebracht, in einem Gesamtvolumen von 2 ml stimuliert und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (Biofuge pico, 30 sec, 13.000 rpm), in 100 µl PBS aufgenommen, mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (Complete Protease Inhibitor Cocktail, PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail, Roche, Mannheim) versetzt und über Nacht bei -80°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen

mit Ultraschall lysiert (Puls: 10sec/10sec, Dauer: 3 min, Amplitude: 90%) und die Proteinkonzentration mittels BCA (Thermo Scientific, Langenselbold) bestimmt. Es wurden je 20 µg Protein in 40 µl 1 x SDS Probenpuffer aufgenommen, für 2 min bei 95°C denaturiert und anschließend neben einem Größenmarker (Color Plus Prestained Protein Ladder, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) auf ein 4-20 prozentiges TRIS/Glycin-Gel (Anamed Elektrophorese GmbH, Gross-Bieberau) aufgetragen. Die Proteine wurden bei 125 V für 1,5 Stunden in einem vertikalen SDS-PAGE-System aufgetrennt. Anschließend wurden sie in einem Semidry-Blotverfahren (Fastblot B44, Biometra GmbH) bei 2 mA/cm² auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Vor Verwendung wurde die Membran in Blotpuffer equilibriert. Die Übertragungszeit betrug in etwa 1 Stunde. Zur Detektion der Proteinbanden wurde die Membran nach dem Blotten für 1 Stunde bei RT in Blockpuffer geblockt und anschließend bei 4°C über Nacht mit dem entsprechenden Primär-Antikörper (Tabelle 4), 1/1000 verdünnt in Blockpuffer, inkubiert.

Tabelle 4: Verwendete Primär-Antikörper

Antikörper	Spezies	Herkunft	Firma
β-Actin	Maus	Kaninchen	NEB ¹
BCL-10	Maus	Kaninchen (IgG)	NEB
CARD11	Maus	Kaninchen	NEB
IκBα	Maus	Maus (IgG1)	NEB
IRAK-1	Maus	Kaninchen (IgG)	NEB
MyD88	Maus	Kaninchen (IgG)	NEB
P-Syk (Tyr519/520)	Maus	Kaninchen	NEB
Syk	Maus	Kaninchen	NEB

Nach dreimaligem Waschen wurde die Membran für 1 Stunde bei RT mit HRP-gekoppeltem Sekundär-Antikörper (anti-rabbit bzw. anti-mouse, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main), 1/1000 verdünnt in Blockpuffer, inkubiert. Nach erneutem Waschen und unter Verwendung von ECL-Reagenz (Thermo Scientific, Langenselbold) wurden die Proteinbanden mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Die Detektion erfolgte mit einer gekühlten CCD-Kamera und Chemi-Capt Software (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell).

¹ New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

4.11 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden jeweils 1×10^7 Zellen pro well in einer 6-well Platte (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH) ausgebracht, in einem Gesamtvolumen von 2 ml stimuliert und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in je 500 µl NP-40 Puffer, ergänzt mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (Complete Protease Inhibitor Cocktail, PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail, Roche, Mannheim), für 40 min bei 4°C lysiert. Nach der Lyse wurden die Zellfragmente für 20 min, bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Kühlzentrifuge 1K15). Die proteinhaltigen Überstände wurden über Nacht mit je 25 µl Protein A/G Plus Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) und 5 µl Antikörper im Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Immunpräzipitate zweimal mit NP-40 Puffer und einmal mit TNE Puffer gewaschen, in 40 µl 1 x SDS Probenpuffer aufgenommen und für 2 min bei 95°C denaturiert. Die denaturierten Proteine wurden über ein 4-20 prozentiges TRIS/Glycin-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und die Proteinbanden mittels Chemilumineszenz detektiert (4.10).

4.12 ELISA

Es wurden jeweils 1×10^5 Zellen pro well in einer 96-well-Platte (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH) ausgebracht, in einem Volumen von 222 µl stimuliert und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Der Nachweis von Zytokinen im zellfreien Überstand erfolgte nach Herstellervorschrift mittels Antikörperpärchen und den dazugehörigen rekombinanten Standards (mouse ELISA MaxTM Standard Set, BioLegend GmbH, Fell). Dabei wurden Verdünnungen der zellfreien Überstände zusammen mit dem Standard auf eine, bereits mit dem Capture-Antikörper beschichteten, 96-well-ELISA-Platte (Half-Area, Greiner Bio-One GmbH) aufgetragen. Als Substrat wurde TMB (BioLegend GmbH, Fell) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm (Messfilter) gegen 570 nm (Referenzfilter).

4.13 FACS

Für die FACS-Analyse wurden jeweils 1×10^6 Zellen in 100 µl PBS, ergänzt mit 2% Zellkultur-BSA, aufgenommen und für eine Stunde bei 4°C mit dem jeweiligen Antikörper (Tabelle 5) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 400 µl PBS gewaschen (Biofuge pico, 30 sec, 13.000 rpm), in 250 µl PBS aufgenommen und im FACS auf die Stärke des Fluoreszenz-Signals untersucht.

Tabelle 5: Verwendete FACS-Antikörper

Antikörper	Spezies	Herkunft	Farbstoff	Firma
CD11b	Maus	Ratte	FITC	BD ²
CD40	Maus	Hamster	FITC	BD
CD80	Maus	Hamster	PE	BD
F4/80	Maus	Ratte	PE/Cy7	BioLegend ³
MHC-II	Maus	Ratte	PE/Cy7	eBioscience ⁴
CD117	Maus	Ratte	PE	BD
IgE	Maus	Ratte	FITC	BD
TLR-4	Maus	Ratte (IgG2 κ)	PE	IMGENEX ⁵
TLR-9	Maus	Maus (IgG1 κ)	FITC	IMGENEX

4.14 Hexosaminidase Assay

Knochenmarks-generierte Mastzellen wurden für die DNP-Stimulation über Nacht mit 10 $\mu\text{g/ml}$ IgE (anti-DNP IgE, SPE-7, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (Multifuge 3 S-R, 5 min, 1.300 rpm), in Tryode-Puffer aufgenommen (5×10^6 Zellen/ml), 100 $\mu\text{l/well}$ in einer 96-well Platte (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH) ausgebracht und für 4 Stunden mit DNP-HSA (20 ng/ml) bzw. P3C (10 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Danach wurden die Zellen in der Platte abzentrifugiert (Multifuge 3 S-R, 5 min, 1.300 rpm) und jeweils 50 μl des Überstands, zur Bestimmung der Menge an freigesetzter Hexosaminidase, in eine frische 96-well Platte (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH) überführt. Um die Menge an intrazellulärer Hexosaminidase zu bestimmen, wurden die restlichen Überstände abgesaugt und die Zellpellets für 5 min in je 100 μl Lysepuffer (Tryode-Puffer + 2% Triton X-100) auf einem Plattenschüttler lysiert. Jeweils 10 μl der Lysate wurden in eine frische 96-well Platte (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH) überführt und mit 40 μl Tryodepuffer verdünnt. Anschließend wurde pro well 50 μl Substratlösung (6,5 mg 4-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-Glucosaminid in 0,1 M Ca-Citratlösung mit pH 4,5) zugegeben

² BD Biosciences, Heidelberg

³ BioLegend GmbH, Fell

⁴ eBioscience, Frankfurt

⁵ IMGENEX, San Diego, CA, USA

und die Platte für 1 Stunde bei RT inkubiert. Abgestoppt wurde mit jeweils 100 μ l Stopplösung (0,4 M Glycin; pH 10,7). Die Auswertung erfolgte mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 405 nm (Messfilter) gegen 630 nm (Referenzfilter).

4.15 Statistik

Die Auswertung der statistischen Analysen erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5.0. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Student's t-Test berechnet. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die in den Abbildungen dargestellten *, ** und *** geben die ermittelten p-Werte <0,05, <0,01 und <0,001 wieder.

5 Ergebnisse

5.1 RhoH im TLR-Signalweg von Mastzellen

5.1.1 Auswirkungen der RhoH-Defizienz auf die Mastzellendifferenzierung

Zu Beginn dieser Arbeit sollte die Funktion von RhoH im TLR-Signalweg von Mastzellen untersucht werden. Dazu wurden Mastzellen aus dem Knochenmark von wt und RhoH-defizienten Mäusen durch IL-3-Selektion generiert. In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass eine RhoH-Defizienz keinerlei Einfluss auf die Mastzellendifferenzierung hat [22]. Dies sollte zunächst bestätigt werden. Dazu wurden 4 Wochen alte Mastzellen auf die Expression Mastzell-spezifischer Marker hin untersucht. Während C-Kit allgemein von hämatopoetischen Stammzellen und myeloiden Vorläuferzellen exprimiert wird, ist eine Kombination aus C-Kit und dem FcεRI nur auf Mastzellen zu finden. Wie aus Abbildung 7 hervorgeht, wurden keine Unterschiede in der C-Kit- und FcεRI-Expression von wt und RhoH-defizienten Mastzellen gefunden. Somit kann bestätigt werden, dass RhoH-defiziente Mäuse keine Defekte in der Mastzellendifferenzierung haben.

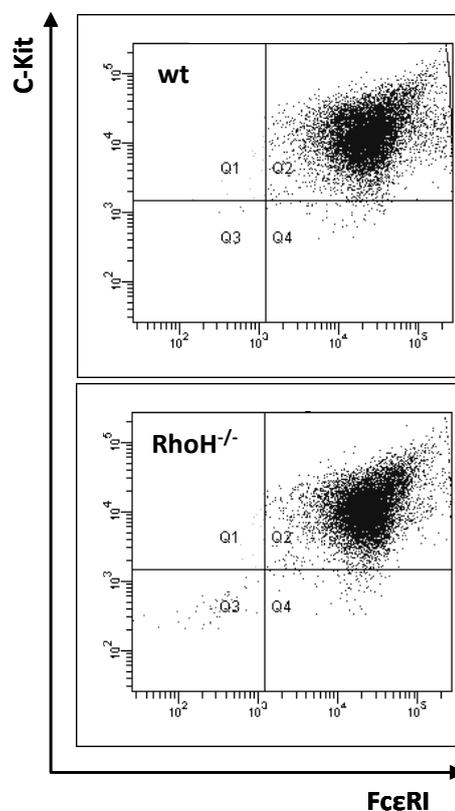


Abbildung 7: Keine Beeinträchtigung der Mastzellendifferenzierung in RhoH-defizienten Mäusen. IL-3-abhängige Differenzierung von Knochenmarkszellen aus wt und RhoH-defizienten Mäusen zu Mastzellen (BMMCs). Nach etwa 4 Wochen waren die BMMCs ausdifferenziert. Zur Differenzierungs-Kontrolle wurde vor jedem Experiment die C-Kit (CD117)- und FcεRI-Expression im FACS bestimmt.

5.1.2 Einfluss von RhoH auf die Degranulation von Mastzellen

Obwohl die Mastzellendifferenzierung in RhoH-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt ist, konnte eine Störung der FcεRI-abhängigen Degranulation und Zytokin-Produktion in RhoH-defizienten Mastzellen beobachtet werden [22]. Ursächlich ist hierfür eine verminderte Syk-Aktivierung dieser Zellen. Die defekte Degranulation RhoH-defizienter Mastzellen sollte im Folgenden bestätigt werden. Ein Maß für die Degranulation von Mastzellen ist die Menge an freigesetzter Hexosaminidase. Eine Degranulation kann sowohl durch Stimulation des FcεRI mit IgE und DNP, als auch durch Stimulation von TLR-2 mit P3C oder PGN [64, 71] hervorgerufen werden. Wie aus Abbildung 8A hervorgeht, war neben der FcεRI-vermittelten Degranulation auch die TLR-2-induzierte Hexosaminidase-Freisetzung in RhoH-defizienten Mastzellen beeinträchtigt. Andere TLR-Liganden wie LPS oder CpG waren nicht in der Lage, eine Degranulation dieser Zellen hervorzurufen, obwohl die entsprechenden Rezeptoren auf Mastzellen nachgewiesen wurden. Abbildung 8B zeigt einen Vergleich der TLR-Expression von Mastzellen und Makrophagen.

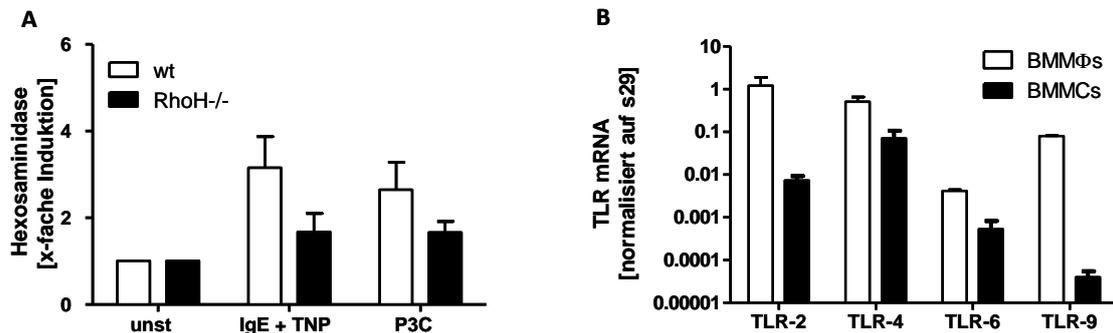


Abbildung 8: Defekte Hexosaminidase-Freisetzung RhoH-defizienter Mastzellen. **A:** Knochenmarksgenerierte Mastzellen von wt und RhoH-defizienten Mäusen wurden für 4 h mit DNP (20 ng/ml) oder P3C (10 µg/ml) stimuliert. DNP-stimulierte Zellen wurden außerdem über Nacht mit IgE (anti-DNP IgE, 10 µg/ml) vorinkubiert. Anschließend wurde die Degranulation im Hexosaminidase-Assay bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von 3 unabhängigen Experimente ± SEM. **B:** Real-time PCR-Analyse zur TLR Expression von Makrophagen (BMMφs) und Mastzellen (BMMCs), die aus dem Knochenmark von wt Mäusen generiert wurden. Dargestellt ist der Mittelwert von 2 (TLR-6, TLR-9) bzw. 4 (TLR-2, TLR-4) unabhängigen Experimenten ± SEM.

Die einzigen Toll-like Rezeptoren, die in Mastzellen gefunden wurden, waren TLR-2, TLR-4, TLR-6 und TLR-9. TLR-1, TLR-3, TLR-5 und TLR-7 konnten dagegen nicht detektiert werden. Im Allgemeinen fiel die Expression der Toll-like Rezeptoren in Mastzellen etwas geringer aus als in Makrophagen. Dies war besonders deutlich bei TLR-9 zu erkennen. Die wichtigsten Rezeptoren zur Erkennung Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien (TLR-2, TLR-4) waren jedoch in Mastzellen in ausreichendem Maße vorhanden.

Neben der, im Vergleich zu Makrophagen, eher geringen TLR-Expression zeigen Mastzellen, die aus dem Knochenmark differenziert wurden, einen Defekt in der TRIF-abhängigen Produktion von Typ 1 Interferonen [81]. Eine der Ursachen ist dabei vermutlich eine verminderte Expression des TLR-Adaptermoleküls TRAM. Da auch die MyD88-abhängige Signaltransduktion muriner Mastzellen durch einen Mangel an Signalmolekülen beeinträchtigt sein könnte, wurden Mastzellen auf die Expression wichtiger TLR-Signalmoleküle hin untersucht und die Ergebnisse mit Makrophagen verglichen. Dabei ergab sich eine vergleichbare Expression des TLR-Adaptermoleküls MyD88 und der Signalmoleküle IRAK-1 und CARD11 in Mastzellen und Makrophagen (Abbildung 9). Unterschiede wurden dagegen bei der Expression von BCL-10 gefunden, welche in Mastzellen weniger stark ausgeprägt war.

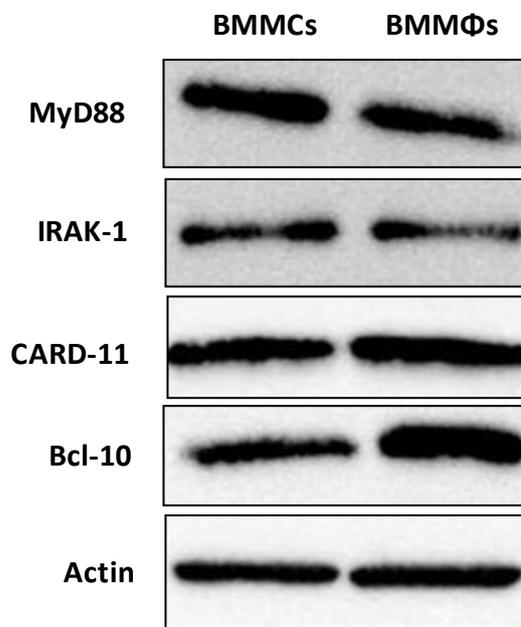


Abbildung 9: WB-Analyse zur Expression von Molekülen aus dem TLR-Signalweg von Mastzellen (BMMCs) und Makrophagen (BMMΦs).

5.1.3 Einfluss von RhoH auf die Zytokinproduktion von Mastzellen

Durch ihre Lokalisation im interstitiellen Bindegewebe und in der Submucosa von Darm und Atemwegen, stehen Mastzellen im ständigen Kontakt zur Außenwelt. Da sie zudem eine Reihe von Toll-like Rezeptoren exprimieren, ist es sehr wahrscheinlich, dass sie maßgeblich an der Einleitung einer Immunantwort beteiligt sind. Nach der Bindung von Toll-like Rezeptoren an pathogene Strukturen, wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB und nachfolgender Zytokin-Expression führt. Im

Folgendes wurde die Funktion von RhoH im TLR-Signalweg von Mastzellen untersucht. Dabei sollte geklärt werden, ob RhoH den TLR-Signalweg auf ähnliche Weise beeinflusst wie FcεRI-vermittelte Signalprozesse. Dazu wurden Mastzellen von wt und RhoH-defizienten Mäusen mit LPS stimuliert und die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF im ELISA bestimmt. Abbildung 10 zeigt, dass sowohl die IL-6- als auch die TNF-Produktion in RhoH-defizienten Mastzellen beeinträchtigt war.

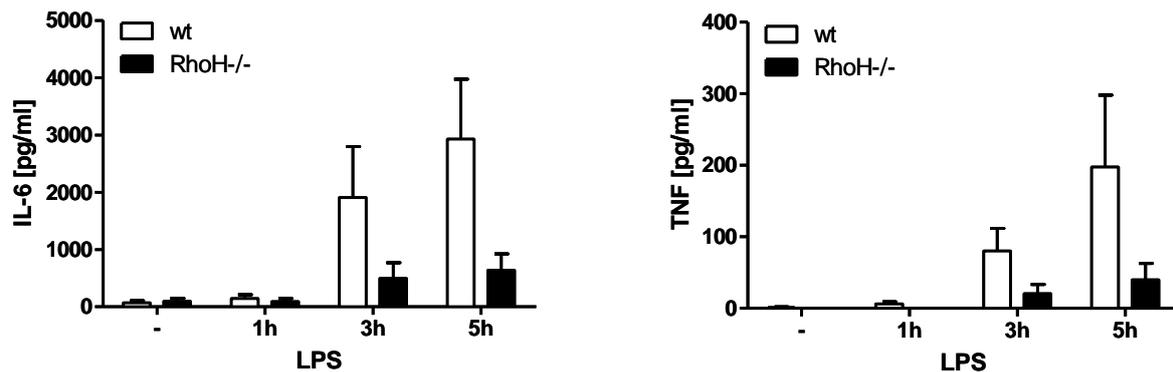


Abbildung 10: Defekte Zytokin-Freisetzung RhoH-defizienter Mastzellen. Knochenmarks-generierte Mastzellen von wt und RhoH-defizienten Mäusen wurden für 1, 3 und 5 h mit LPS (10 µg/ml) stimuliert. Anschließend wurde die Zytokin-Freisetzung im ELISA bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von 3 unabhängigen Experimente ± SEM.

Um herauszufinden, ob die verminderte Zytokin-Produktion RhoH-defizienter Mastzellen auf einem allgemeinen Defekt der Freisetzung oder einem Synthese-Defekt beruht, wurde außerdem die Menge an gebildeter IL-6 und TNF mRNA bestimmt. Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, war bereits die mRNA-Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF in RhoH-defizienten Mastzellen eingeschränkt. Dies war sowohl nach LPS- als auch nach P3C-Stimulation zu beobachten.

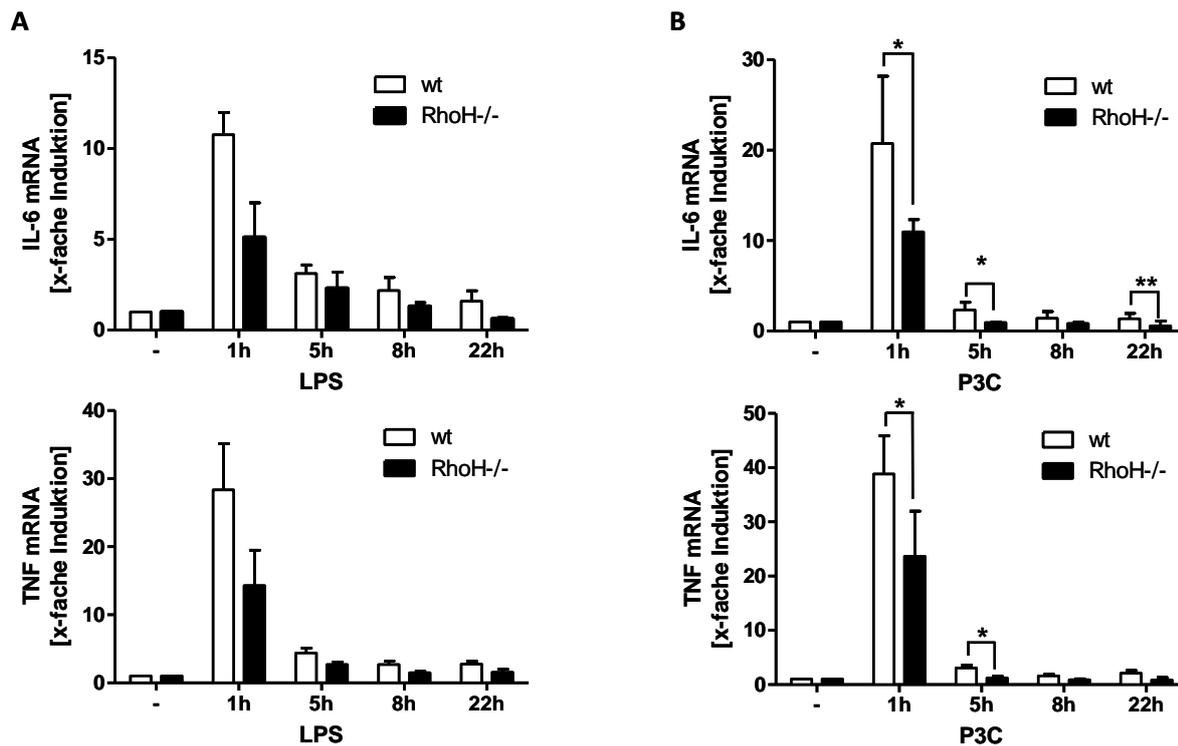


Abbildung 11: Defekte Zytokin-Synthese RhoH-defizienter Mastzellen. **A, B:** Mastzellen, generiert aus dem Knochenmark von wt und RhoH-defizienten Mäusen, wurden für die angegebenen Zeiten mit jeweils 10 µg/ml LPS (A) oder P3C (B) stimuliert. Anschließend wurde mittels quantitativer RT-PCR die Menge an gebildeter IL-6 und TNF mRNA bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von 3 unabhängigen Experimente ± SEM. Statistische Relevanzen wurden mit dem Student's t-Test berechnet und die ermittelten p-Werte <0,05, <0,01 und <0,001 als *, ** und *** angegeben.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die Beeinträchtigung der IL-6 und TNF mRNA-Produktion auf einen Defekt der NFκB-Aktivierung dieser Zellen zurückzuführen ist. Dazu wurde die Degradation des inhibitorischen Proteins IκBα in wt und RhoH-defizienten Mastzellen bestimmt. IκBα verhindert in der Regel einen Kerntransport von NFκB. Nach TLR-Stimulation wird IκBα jedoch phosphoryliert und über das Proteasom abgebaut, wodurch ein Kerntransport von NFκB ermöglicht wird. Abbildung 12 zeigt eine Degradation von IκBα in wt Zellen nach 60-minütiger LPS-Stimulation. In RhoH-defizienten Mastzellen wurde zu diesem Zeitpunkt keine Degradation des inhibitorischen Proteins IκBα beobachtet. Die Daten deuten somit darauf hin, dass RhoH-defiziente Mastzellen kein Problem mit der Freisetzung von Mediatoren haben, sondern eher einen Defekt in der Signaltransduktion.

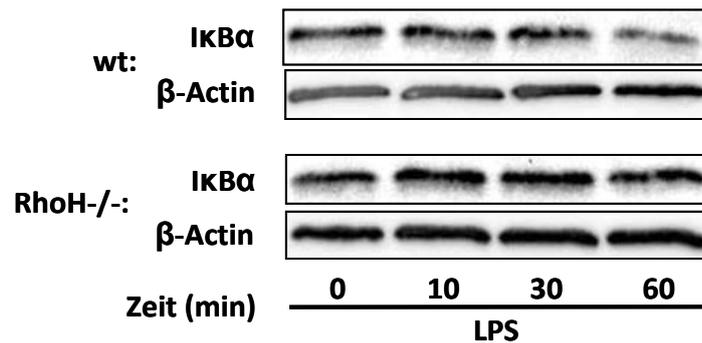


Abbildung 12: Defekte NFκB-Aktivierung RhoH-defizienter Mastzellen. Knochenmarks-generierte Mastzellen von wt und RhoH-defizienten Mäusen wurden mit LPS (10 µg/ml) stimuliert und anschließend die Degradation von IκBα im WB analysiert. Dargestellt sind repräsentative Daten von 2 unabhängigen Experimenten.

5.1.4 Einfluss von RhoH auf die TLR-Expression von Mastzellen

Frühere Studien haben gezeigt, dass RhoH die Expression von Rezeptoren wie CD11c [25] oder CD123 [82] beeinflussen kann. Im Folgenden wurde untersucht, ob RhoH auch die TLR-Expression von Mastzellen moduliert. Möglicherweise könnte eine verminderte TLR-Expression sogar die Defekte NFκB-Aktivierung RhoH-defizienter Mastzellen erklären. Zunächst wurde die Menge an mRNA verschiedener Toll-like Rezeptoren bestimmt. Da an der Signaltransduktion von TLR-4 noch Co-Rezeptoren wie MD-2 und CD14 beteiligt sind, wurde auch deren Expression analysiert. Allgemein wurden relativ große Mengen an TLR-2, TLR-4 und MD-2 mRNA in Mastzellen gefunden (Abbildung 13A). Dagegen war die Expression von TLR-6 und TLR-9 eher schwach ausgeprägt. CD14 konnte gar nicht detektiert werden. Wie in Abbildung 13A zu erkennen ist, zeigten RhoH-defiziente Mastzellen statt einer verminderten sogar eine erhöhte TLR-Expression. Dies war besonders deutlich bei TLR-6 und TLR-9 zu erkennen. Somit kann die defekte NFκB-Aktivierung RhoH-defizienter Mastzellen nicht durch eine verminderte TLR-Expression dieser Zellen erklärt werden. Um zu überprüfen, ob die Unterschiede in der TLR-Expression auch auf Proteinebene zu finden sind, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Diese musste jedoch auf Grund eines Mangels an geeigneten TLR-Antikörpern auf die Expression von TLR-4 und TLR-9 beschränkt werden. Wie aus Abbildung 13B hervorgeht, zeigten RhoH-defiziente Mastzellen eine erhöhte TLR-4- und TLR-9-Protein-Expression. Somit konnten die RNA-Daten bestätigt werden.

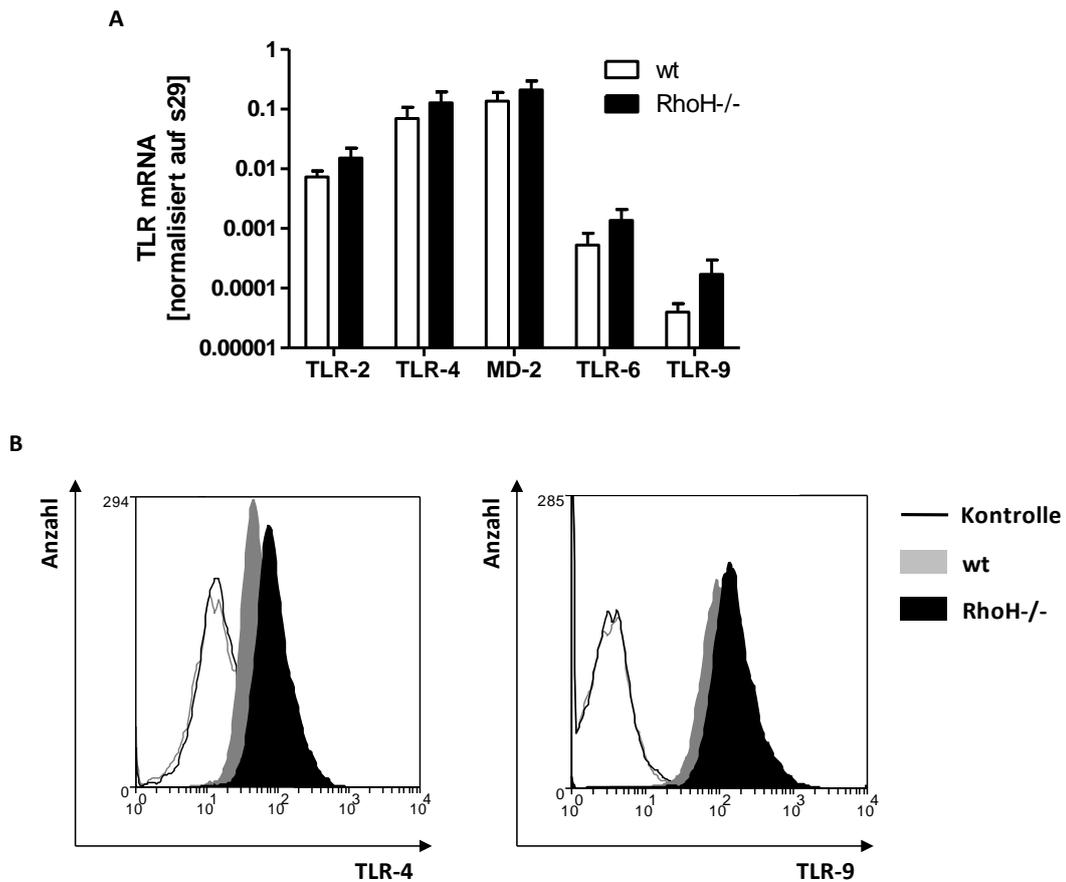


Abbildung 13: Erhöhte TLR-Expression in RhoH-defizienten Mastzellen. **A:** Real-time PCR-Analyse zur TLR-Expression von Mastzellen, die aus dem Knochenmark von wt und RhoH-defizienten Mäusen generiert wurden. Dargestellt ist der Mittelwert von mindestens 2 unabhängigen Experimenten \pm SEM. **B:** FACS-Analyse der TLR-4- und TLR-9-Protein-Expression von Knochenmarks-generierten Mastzellen mit PE-konjugierten TLR-4-Antikörpern, FITC-konjugierten TLR-9-Antikörpern und den entsprechenden Isotyp-Kontrollen. Dargestellt sind repräsentative Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

5.2 RhoH im TLR-Signalweg von Makrophagen

5.2.1 Regulation der RhoH-Expression durch TLR-Liganden

Wichtige TLR-exprimierende Zellen sind Makrophagen. Nach TLR-Stimulation setzen sie eine Reihe von Zytokinen frei, die wiederum andere Immunzellen an den Entzündungsherd locken. Somit sind sie maßgeblich an der Einleitung einer Immunantwort beteiligt. Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss RhoH auf den TLR-Signalweg von Makrophagen hat. Zuvor musste jedoch geklärt werden, ob RhoH überhaupt von Makrophagen exprimiert wird. Wie aus Abbildung 14 hervorgeht, wurden ähnliche Mengen an RhoH in primären Mastzellen und primären Makrophagen gefunden. Die Makrophagen-Zelllinie Raw 264.7 exprimiert dagegen vergleichsweise wenig RhoH.

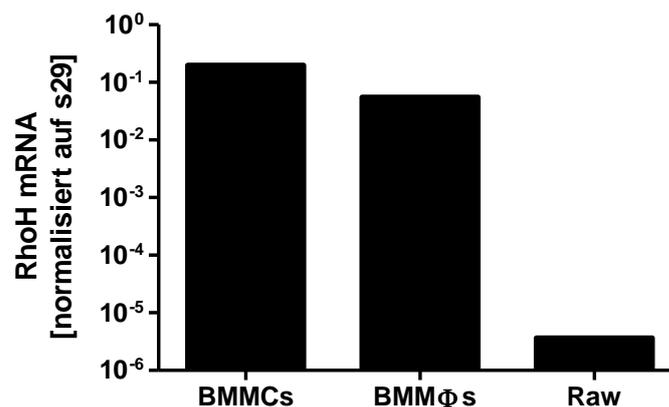


Abbildung 14: RhoH-Expression primärer Makrophagen. Real-time PCR-Analyse zur Expression von RhoH mRNA in Knochenmarks-generierten Mastzellen (BMMCs), Knochenmarks-generierten Makrophagen (BMMΦs) und Raw 264.7 Zellen.

Da RhoH konstitutiv aktiv ist, ist es wahrscheinlich dass die Expression streng reguliert wird, um selektive Funktionen zu ermöglichen. Tatsächlich wurde eine Regulation der RhoH-Expression nach TLR-Stimulation beobachtet (Abbildung 15). Obwohl alle getesteten TLR-Liganden in der Lage waren die mRNA-Produktion von RhoH zu hemmen, gab es Unterschiede in den jeweiligen Kinetiken. Eine maximale Hemmung der RhoH-Expression wurde beispielsweise 1 Stunde nach LPS- und PIC-Stimulation, 5 Stunden nach CpG- und R848-Stimulation bzw. 8 Stunden nach P3C-Stimulation beobachtet.

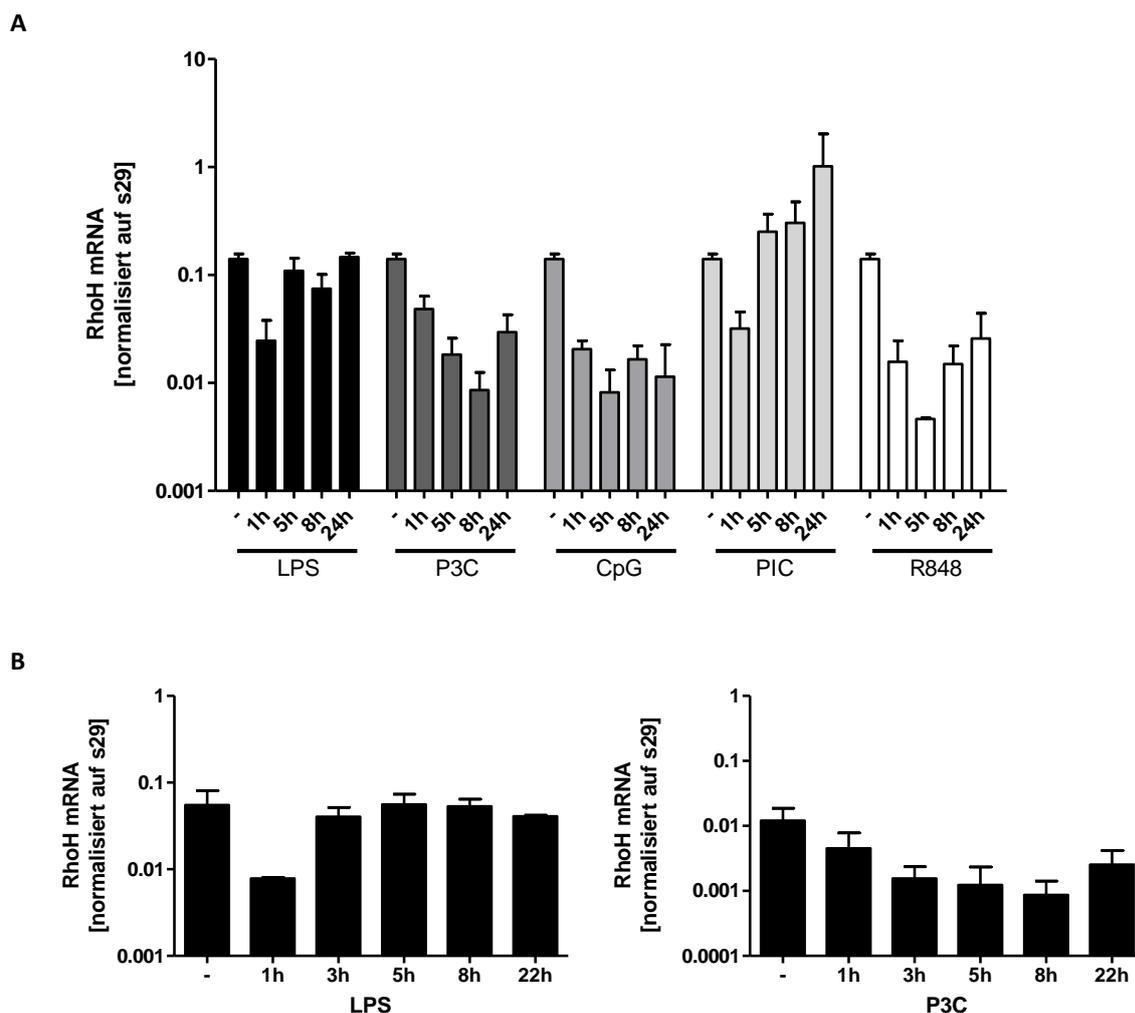


Abbildung 15: Regulation der RhoH-Expression durch TLR-Liganden: **A:** Makrophagen, generiert aus murinem Knochenmark, wurden für die angegebenen Zeiten mit LPS, P3C, CpG, PIC und R848 (jeweils 0,6 μ M) stimuliert. Anschließend wurde mittels quantitativer RT-PCR die RhoH-Expression bestimmt. **B:** Raw 264.7 Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit LPS (10 μ g/ml) oder P3C (10 μ g/ml) stimuliert. Die Menge an vorhandener RhoH mRNA wurde anschließend mittels quantitativer RT-PCR ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert von mindestens 2 unabhängigen Experimenten \pm SEM.

5.2.2 Auswirkungen der RhoH-Defizienz auf die Differenzierung von Makrophagen

Obwohl RhoH eine wichtige Funktion im BCR- und Fc ϵ RI-Signalweg übernimmt, wurde keine Beeinträchtigung der B-Zell oder Mastzell-Entwicklung in RhoH-defizienten Mäusen beobachtet [18, 22]. Im Folgenden wurde überprüft, ob RhoH die M-CSF-abhängige Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Makrophagen beeinflusst. Dazu wurden murine Knochenmarkszellen von wt und RhoH-defizienten Mäusen eine Woche lang in M-CSF-haltigem Medium (L929-Kulturüberstände) kultiviert und anschließend auf die Expression Makrophagen-spezifischer Marker hin untersucht. FACS-Analysen zeigten, dass eine Woche

nach Differenzierung sowohl wt als auch RhoH-defiziente Makrophagen komplett CD11b und F4/80 positiv waren (Abbildung 16A). Somit scheint die Makrophagendifferenzierung in RhoH-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt zu sein.

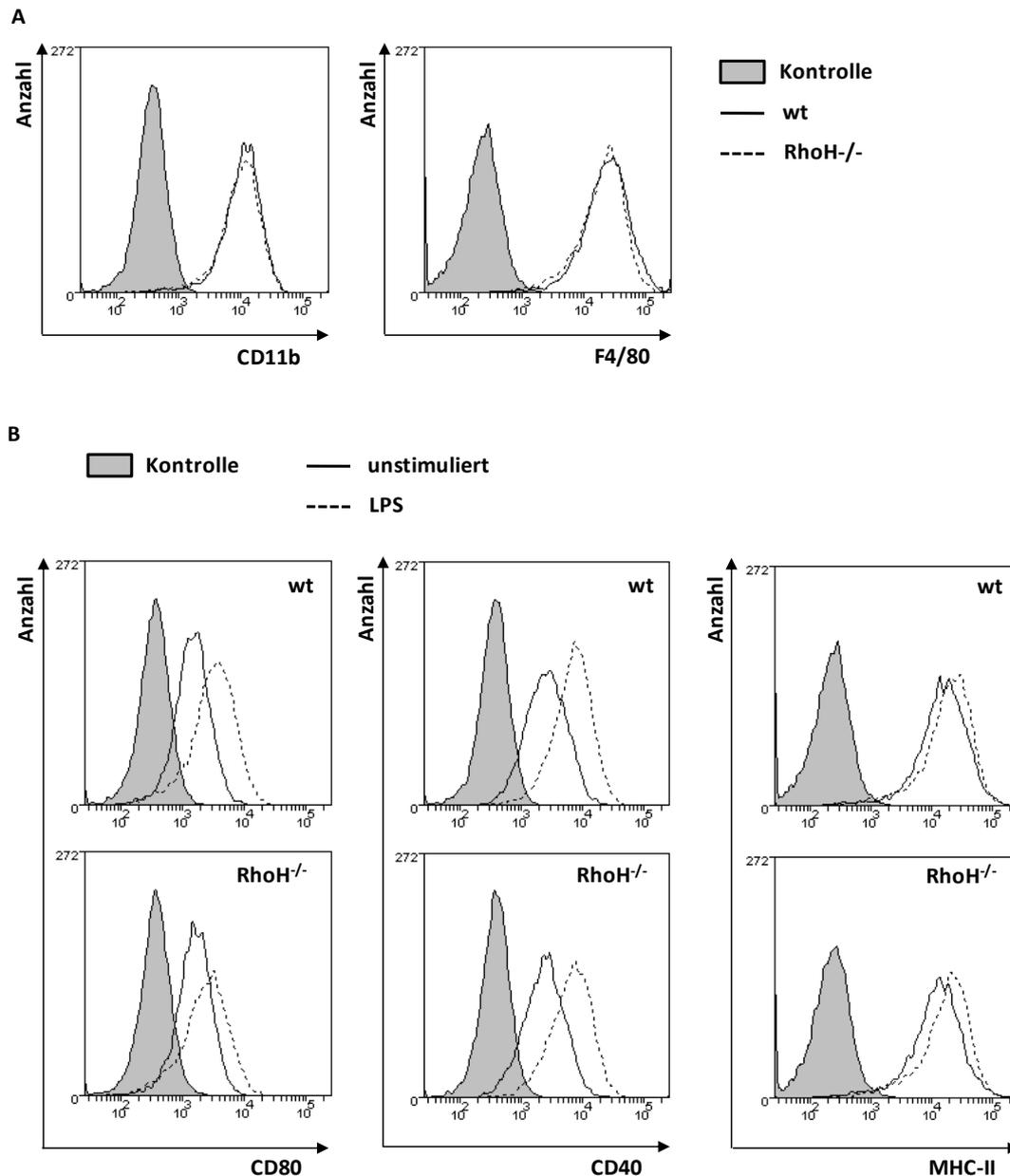


Abbildung 16: Keine Beeinträchtigung der Makrophagendifferenzierung in RhoH-Defizienten Mäusen. M-CSF-abhängige Differenzierung von Knochenmarkszellen aus wt und RhoH-defizienten Mäusen zu Makrophagen (BMMΦs). Nach einer Woche waren die BMMΦs ausdifferenziert. **A:** Zur Differenzierungskontrolle wurde die CD11b- und F4/80-Expression im FACS bestimmt. **B:** BMMΦs wurden für 12 Stunden mit LPS (10 µg/ml) stimuliert und anschließend im FACS auf CD80-, CD40- und MHC-II-Expression hin untersucht. Dargestellt sind repräsentative Daten für 2 unabhängige Experimente.

Außerdem wurde eine LPS-abhängige Induktion der CD80-, CD40- und MHC-II-Expression in wt und RhoH-defizienten Makrophagen beobachtet (Abbildung 16B). CD80 ist ein kostimulatorisches Molekül der T-Zellaktivierung, CD40 dient der Makrophagen-eigenen

Aktivierung und MHC-II spielt eine Rolle bei der Aktivierung von T-Helferzellen über die Präsentation von phagozytiertem Material. Die Daten deuten somit darauf hin, dass RhoH-defiziente Makrophagen ihre Funktion bei der Einleitung einer Immunantwort erfüllen können.

5.2.3 Einfluss von RhoH auf die Zytokin-Produktion von Makrophagen

Im Gegensatz zu Mastzellen zeigten RhoH-defiziente Makrophagen eine verstärkte Produktion an pro-inflammatorischen Zytokinen. Dies wurde sowohl nach LPS- als auch nach P3C-Stimulation beobachtet (Abbildung 17).

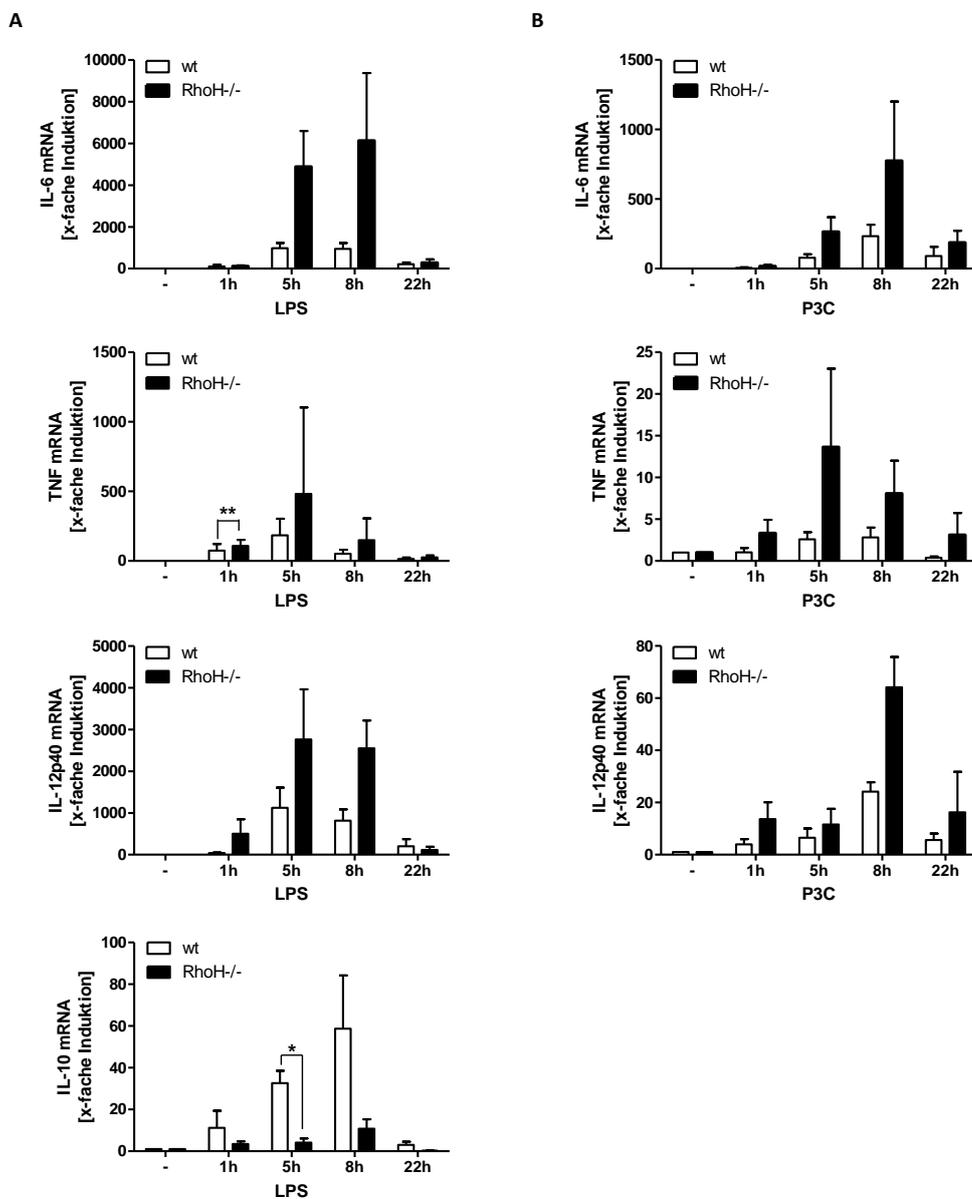


Abbildung 17: Verstärkte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine in RhoH-defizienten Makrophagen. Knochenmarks-generierte Makrophagen wurden für die angegebenen Zeiten mit jeweils 10 µg/ml LPS (A) oder P3C (B) stimuliert. Anschließend wurde mittels quantitativer RT-PCR die Menge an gebildeter IL-6, TNF, IL-12p40 und IL-10 mRNA bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von 3 unabhängigen Experimente ± SEM. Statistische Relevanzen wurden mit dem Student's t-Test berechnet und die ermittelten p-Werte <0,05, <0,01 und <0,001 als *, ** und *** angegeben.

Neben IL-6 und TNF wurde in Makrophagen zusätzlich das pro-inflammatorische Zytokin IL-12p40 sowie das inhibitorische Zytokin IL-10, welches jedoch nur durch LPS induziert wurde, nachgewiesen. Beide Zytokine konnten in Mastzellen nicht gefunden werden. Während RhoH-defiziente Makrophagen erhöhte Mengen an TNF, IL-6 und IL-12p40 produzierten, zeigten sie gleichzeitig einen Defekt in der IL-10-Produktion.

Um herauszufinden, ob die erhöhte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine auf einer verstärkten NF κ B-Aktivierung RhoH-defizienter Makrophagen beruht, wurde der proteasomale Abbau des inhibitorischen Proteins I κ B α im WB analysiert. Wie aus Abbildung 18 hervorgeht, zeigten RhoH-defiziente Makrophagen tatsächlich eine schnellere und länger anhaltende I κ B α -Degradation als wt Makrophagen.

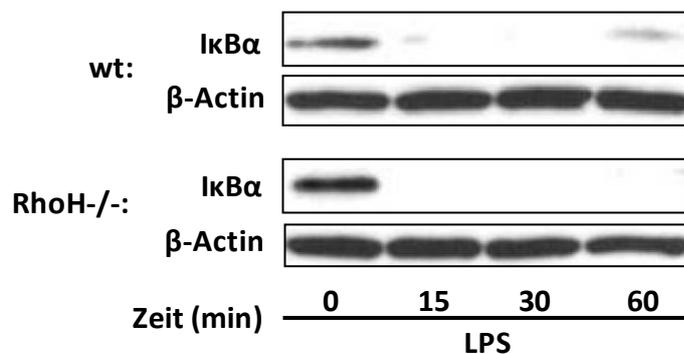


Abbildung 18: Erhöhte I κ B α -Degradation RhoH-defizienter Makrophagen. Knochenmarks-generierte Makrophagen von wt und RhoH-defizienten Mäusen wurden mit LPS (10 μ g/ml) stimuliert und anschließend die Degradation von I κ B α im WB analysiert. Dargestellt sind repräsentative Daten von 3 unabhängigen Experimenten.

Des Weiteren wurde ein Luziferase Reportergen Assay durchgeführt, in dem die NF κ B-Aktivität RhoH-überexprimierender Raw 264.7 Zellen bestimmt wurde. Diese zeigten im Vergleich zu mock-transfizierten Zellen eine Hemmung der TLR-induzierten NF κ B-Aktivierung (Abbildung 19A). Somit konnten die WB-Daten bestätigt werden. Eine noch effektivere Hemmung der NF κ B-Aktivität wurde in Zellen gefunden, die mit einer C-terminalen Deletionsmutante von RhoH (Δ CaaX) transfiziert wurden (Abbildung 19B). Das C-terminale Ende der Rho-GTPasen enthält einen konservierten Zystein-Rest. Dieser kann posttranslational durch Isoprenylierung modifiziert werden, wodurch eine Interaktion mit der Plasmamembran ermöglicht wird. Die Daten deuten somit darauf hin, dass RhoH im Zytoplasma vorliegen muss, um eine effektive Hemmung des Transkriptionsfaktors zu induzieren.

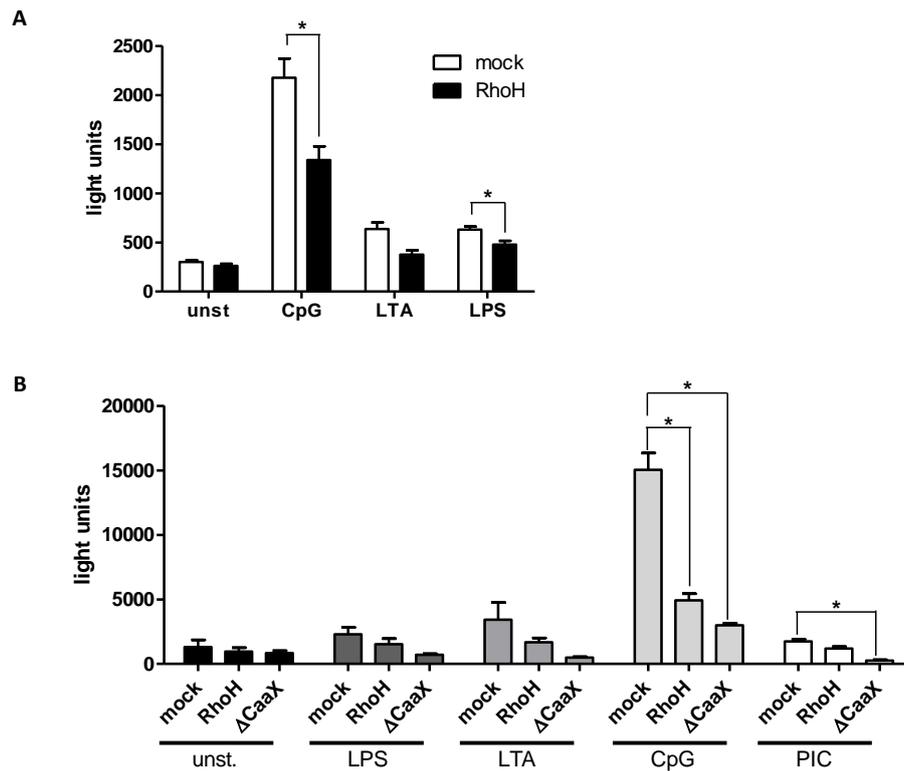


Abbildung 19: Hemmung der NFκB-Aktivierung in RhoH-überexprimierenden Zellen. **A:** Raw 264.7 Zellen wurden mit RhoH bzw. einer Leervektor-Kontrolle (mock) und einem NFκB-Luziferase Reporterkonstrukt transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 16 Stunden mit CpG (1 μM), LTA (10 μg/ml) oder LPS (10 μg/ml) stimuliert und die NFκB-Aktivität im Luziferase Assay bestimmt. **B:** Raw 264.7 Zellen wurden entweder mit wt-RhoH, einer C-terminalen Deletionsmutante von RhoH (ΔCaaX) oder einer Leervektor-Kontrolle (mock) und einem NFκB-Luziferase Reporterkonstrukt transfiziert. Fünf Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 16 Stunden mit LPS (10 μg/ml), LTA (10 μg/ml), CpG (1 μM) oder PIC (30 μg/ml) stimuliert und die NFκB-Aktivität im Luziferase Assay bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von 3 unabhängigen Experimente ± SEM. Statistische Relevanzen wurden mit dem Student's t-Test berechnet und die ermittelten p-Werte <0,05, <0,01 und <0,001 als *, ** und *** angegeben.

5.2.4 Einfluss von RhoH auf die TLR-Expression von Makrophagen

Als nächstes sollte untersucht werden, ob RhoH neben der TLR-Expression von Mastzellen auch die TLR-Expression von Makrophagen beeinflusst. RhoH-defiziente Mastzellen zeigten eine erhöhte TLR-Expression im Vergleich zu wt Zellen (Abbildung 13). In Makrophagen könnte eine erhöhte TLR-Expression zu einer verstärkten NFκB-Aktivierung RhoH-defizienter Zellen führen. Während wt und RhoH-defiziente Makrophagen ähnliche Mengen an TLR-4 (mRNA und Protein) exprimierten, konnten unterschiedliche Mengen an TLR-2 mRNA in diesen Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 20). Im Gegensatz zu Mastzellen, zeigten RhoH-defiziente Makrophagen jedoch eine verminderte TLR-2-Expression. Da kein geeigneter TLR-2-Antikörper zur Verfügung stand, konnte allerdings nicht überprüft werden, ob Unterschiede in der TLR-2-Expression auch auf Proteinebene zu finden sind.

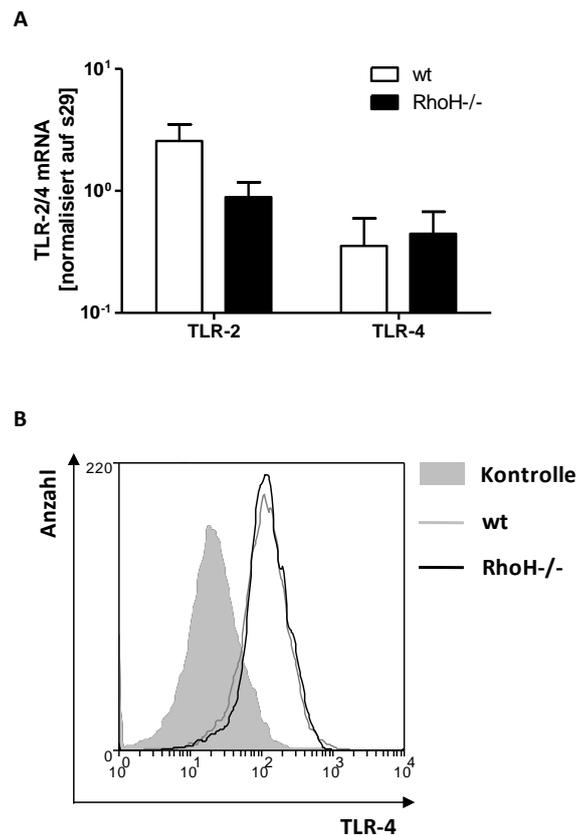


Abbildung 20: TLR-Expression muriner Makrophagen. **A:** Real-time PCR-Analyse zur TLR-2- und TLR-4-Expression von Makrophagen, die aus dem Knochenmark von wt und RhoH-defizienten Mäusen generiert wurden. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten \pm SEM. **B:** FACS-Analyse der TLR-4-Protein-Expression von Knochenmarks-generierten Makrophagen mit PE-konjugierten TLR-4-Antikörpern und der entsprechenden Isotyp-Kontrolle. Dargestellt sind repräsentative Daten von 2 unabhängigen Experimenten.

Des Weiteren wurde untersucht, wie sich eine Stimulation von wt und RhoH-defizienten Makrophagen auf die Expression der Toll-like Rezeptoren auswirkt. Abbildung 21A zeigt eine Induktion der TLR-2 mRNA nach P3C-Stimulation. Diese war besonders stark in RhoH-defizienten Makrophagen ausgeprägt und konnte mit Hilfe eines NF κ B-Inhibitors blockiert werden (Abbildung 21B). Da es sich hierbei offensichtlich um einen NF κ B-abhängigen Prozess handelt, ist es unwahrscheinlich, dass eine verstärkte TLR-2-Expression für eine erhöhte Zytokin-Induktion der RhoH-defizienten Makrophagen verantwortlich ist. Vielmehr scheint eine verstärkte NF κ B-Aktivierung RhoH-defizienter Makrophagen die TLR-2-Induktion zu begünstigen. Im Gegensatz zur TLR-2-Induktion wurden keine Unterschiede in der Regulation der TLR-4-Expression zwischen wt und RhoH-defizienten Makrophagen gefunden. Abbildung 21C zeigt die Internalisierung des TLR-4 nach LPS-Stimulation. Demzufolge scheint RhoH sowohl in Mastzellen als auch in Makrophagen unterhalb von TLR-4/TLR-2, aber oberhalb von NF κ B in den TLR-Signalweg einzugreifen.

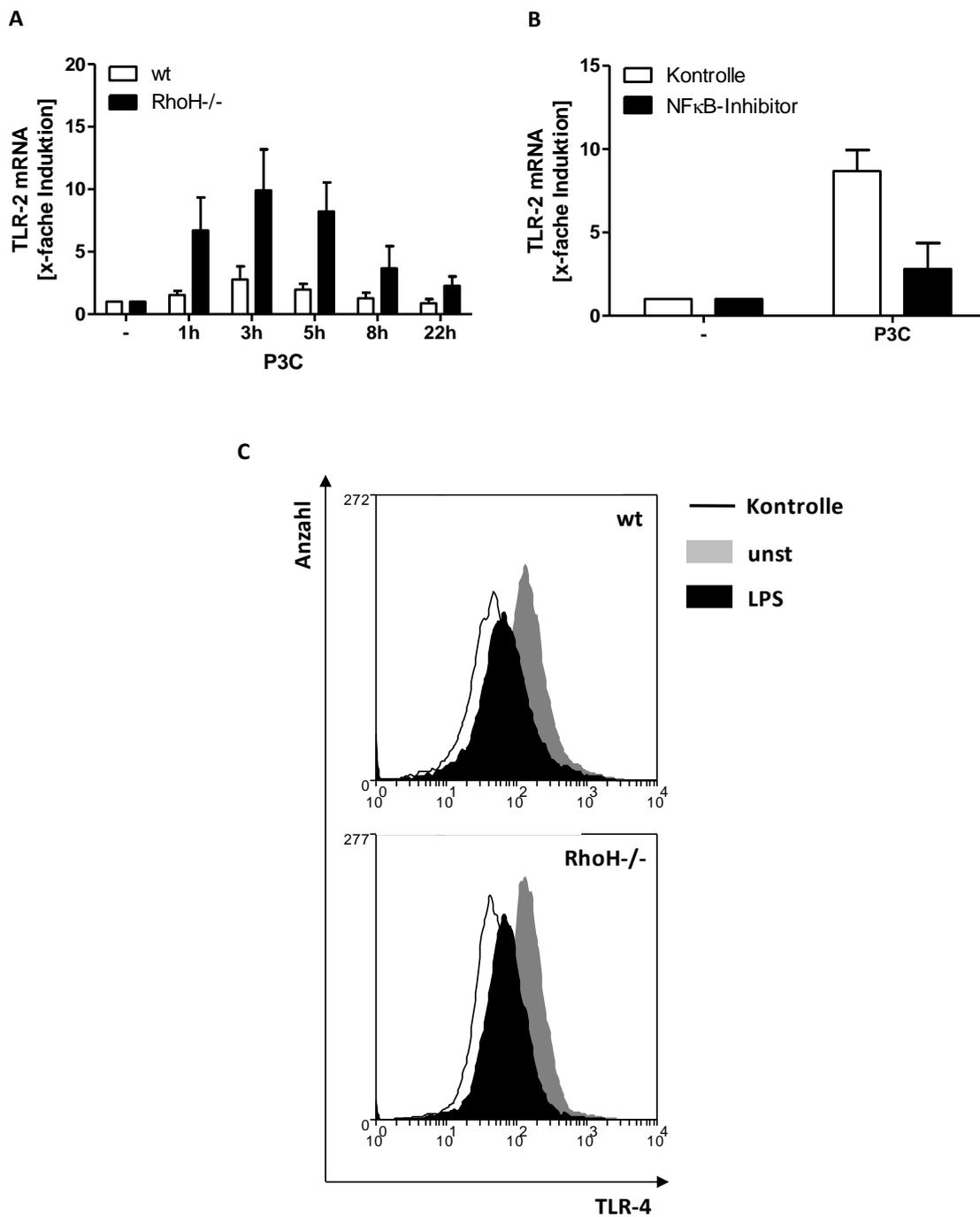


Abbildung 21: TLR-Expression nach Stimulation. Makrophagen wurden aus dem Knochenmark von wt und RhoH-defizienten Mäusen generiert. **A:** Real-time PCR-Analyse zur TLR-2-Expression nach P3C-Stimulation (10 µg/ml). Dargestellt ist der Mittelwert von 3 unabhängigen Experimente ± SEM. **B:** RhoH-defiziente Makrophagen wurden für 3 Stunden in An- und Abwesenheit des NFκB-Inhibitors Bay 11-7082 (10 µM) mit P3C (10 µg/ml) stimuliert und die TLR-2-Expression mittels Real-Time PCR analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert von 2 unabhängigen Experimente ± SEM. **C:** FACS-Analyse zur TLR-4-Expression nach 90 min LPS-Stimulation (10 µg/ml).

5.2.5 Die Funktion von Syk in der TLR-vermittelten Signaltransduktion von Makrophagen

Frühere Studien haben gezeigt, dass die Tyrosinkinase Syk durch verschiedene TLR-Liganden aktiviert werden kann. So wurde sowohl eine allgemeine Tyrosin-Phosphorylierung nach LPS-Stimulation [83] als auch eine spezifische Phosphorylierung des Tyrosin-Rests 352 nach LPS-, PIC- und CpG-Stimulation beobachtet [84]. Neben dem Tyrosin-Rest 352 besitzt Syk noch eine weitere aktivierende Phosphorylierungsstelle, die bei der Maus durch die beiden Tyrosin-Reste 519/520 gekennzeichnet ist. Für Mastzellen wurde gezeigt, dass die FcεRI-vermittelte Phosphorylierung der beiden Tyrosin-Reste 519/520 RhoH-abhängig verläuft [22]. Nun sollte geklärt werden, ob eine solche Phosphorylierung auch nach TLR-Stimulation auftritt. Tatsächlich wurde in Makrophagen von wt Mäusen eine Phosphorylierung der Tyrosin-Reste 519/520 nach LPS-Stimulation beobachtet (Abbildung 22). RhoH-defiziente Mäuse zeigten dagegen keine LPS-abhängige Syk-Phosphorylierung. Allerdings wurde eine Voraktivierung von Syk in RhoH-defizienten Makrophagen beobachtet. Diese verschwand jedoch bereits nach 5-minütiger LPS-Stimulation.

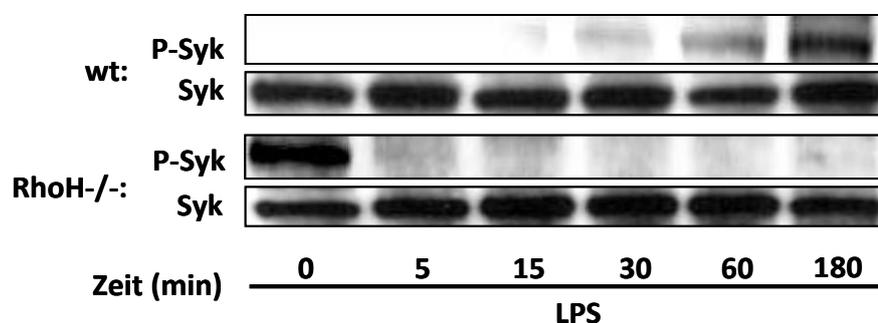


Abbildung 22: TLR-induzierte Syk-Phosphorylierung. Makrophagen wurden aus dem Knochenmark von wt und RhoH-defizienten Mäusen generiert und für die angegebenen Zeiten mit LPS (10 µg/ml) stimuliert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit Syk-Antikörpern durchgeführt und die Phosphorylierung der Tyrosin-Reste 519/520 im WB analysiert.

Die Funktion von Syk in TLR-vermittelten Signalprozessen scheint vielseitig zu sein. So wurde beispielsweise gezeigt, dass Syk in der Monozyten-Zelllinie THP-1 eine wichtige Rolle bei der Tyrosin-Phosphorylierung von TLR-4 spielt [83]. Eine solche Phosphorylierung scheint Voraussetzung für die LPS-abhängige NFκB-Aktivierung und Zytokin-Produktion zu sein [85]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Syk in murinen Makrophagen einen negativen Feedbackmechanismus der pro-inflammatorischen Zytokin-Produktion induziert [84]. Um den Einfluss von Syk auf die TLR-vermittelte Zytokin-Produktion von Makrophagen zu

untersuchen, wurde die Syk-Phosphorylierung mit Piceatannol gehemmt. Piceatannol ist ein zellpermeabler Pflanzen-Metabolit, der in RBL-2H3 Zellen selektiv Syk und dessen Funktion in der FcεRI-vermittelten Signaltransduktion hemmt. Während Piceatannol-behandelte Makrophagen verstärkt pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6 und TNF produzierten, wurde eine Hemmung der IL-10- und IL-12p40-Produktion in diesen Zellen festgestellt (Abbildung 23). Somit spiegelt die Syk-Inhibition zumindest teilweise den Phenotyp RhoH-defizienter Makrophagen wieder. Eine Ausnahme bildet dabei IL-12p40, welches von RhoH-defizienten Makrophagen verstärkt exprimiert wird, wohingegen die IL-12p40 Produktion durch Piceatannol gehemmt wird.

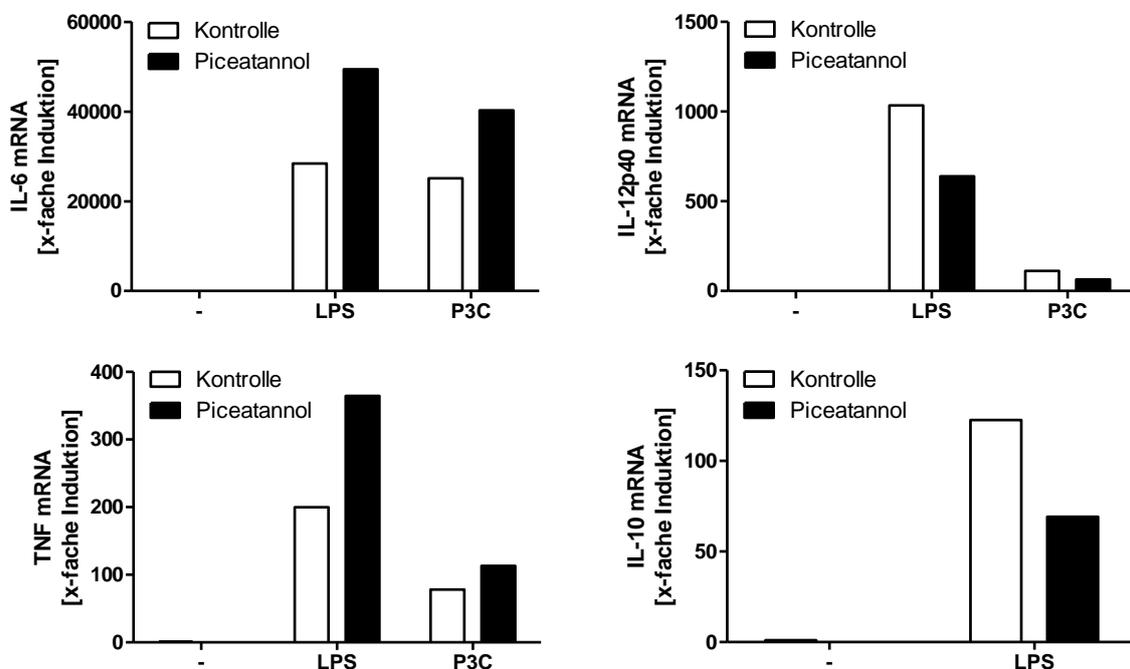


Abbildung 23: Inhibition der Syk-Phosphorylierung mit Piceatannol in Makrophagen. Knochenmarksgenerierte Makrophagen von wt Mäusen wurden für 1 Stunde mit Piceatannol (10 μ M) vorinkubiert bevor sie für weitere 5 Stunden mit LPS (10 μ g/ml) stimuliert wurden. Die Zytokin-Expression wurde mittels quantitativer Real-time PCR analysiert. Dargestellt sind repräsentative Daten von 6 (IL-6, TNF), 4 (IL-12p40) und 3 (IL-10) unabhängigen Experimenten.

Makrophagen zeigten keine Hemmung der IL-6- und TNF-Produktion nach Syk-Inhibition, obwohl eine durch Syk-induzierte TLR-Phosphorylierung Voraussetzung für die NF κ B-abhängige Zytokin-Produktion zu sein scheint. Daher ist es möglich, dass in diesen Zellen andere Kinasen die Rolle von Syk in der TLR-4-Phosphorylierung übernehmen. Deshalb wurde untersucht, wie sich eine allgemeine Inhibition von Src-Kinasen auf die LPS-vermittelte Zytokin-Produktion von Makrophagen auswirkt. Zur Inhibition der Src-Kinasen

wurden die beiden Inhibitoren PP1 (für Lck, Fyn, Hck und Src) und PP2 (für Lck, Fyn und Hck) verwendet. Sowohl PP1 als auch PP2 blockierten die gesamte Zytokin-Produktion muriner Makrophagen (Abbildung 24). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass tatsächlich neben Syk noch andere Kinasen an der TLR-Signaltransduktion von Makrophagen beteiligt sind.

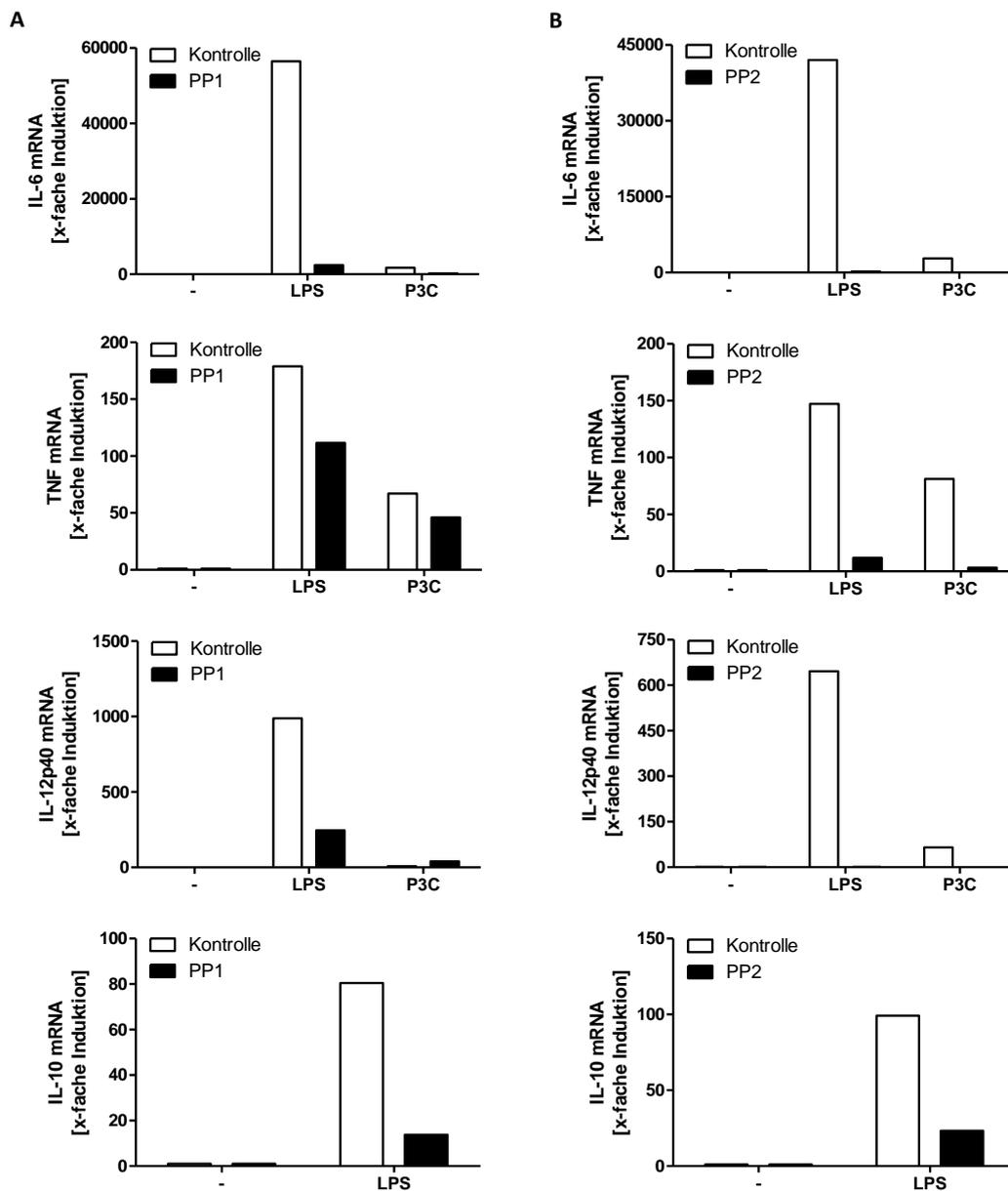


Abbildung 24: Inhibition der Src-Kinasen mit PP1 und PP2 in Makrophagen. Knochenmarks-generierte Makrophagen von wt Mäusen wurden für 1 Stunde mit jeweils 10 μ M PP1 (A) und PP2 (B) vorinkubiert bevor sie für weitere 5 Stunden mit LPS (10 μ g/ml) stimuliert wurden. Die Zytokin-Expression wurde mittels quantitativer Real-time PCR analysiert. Dargestellt sind repräsentative Daten von 2 unabhängigen Experimenten.

6 Diskussion

RhoH ist eine atypische Rho-GTPase, die an vielen NF κ B-abhängigen Prozessen beteiligt ist. So wurde gezeigt, dass RhoH in Mastzellen die Fc ϵ RI-vermittelte Zytokin-Produktion unterstützt [22]. In HEK und Jurkat Zellen wurde dagegen eine Hemmung der TNF Rezeptor-vermittelten NF κ B-Aktivierung durch RhoH beobachtet [16]. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass RhoH noch weitere Signalwege, mit Beteiligung von NF κ B, beeinflusst. In dieser Arbeit sollte die Funktion von RhoH im TLR-Signalweg untersucht werden. Toll-like Rezeptoren sind Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems, die sowohl Zellwandbestandteile als auch DNA- und RNA-Moleküle von Pathogenen erkennen. Nach erfolgter Liganden-Bindung setzen Toll-like Rezeptoren eine Signalkaskade in Gang, die zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und nachfolgender Zytokin-Produktion führt. Zunächst sollte die Funktion von RhoH im TLR-Signalweg von Mastzellen untersucht werden. Dabei sollte überprüft werden, ob RhoH den TLR-Signalweg dieser Zellen auf ähnliche Weise beeinflusst wie die IgE-abhängige Zytokin-Induktion.

Mastzellen wurden aus dem Knochenmark von wt und RhoH-defizienten Mäusen durch IL-3-Selektion generiert. Frühere Studien hatten bereits gezeigt, dass eine RhoH-Defizienz keinerlei Einfluss auf die Mastzelldifferenzierung hat [22]. Dies konnte von uns bestätigt werden (Abbildung 7). Obwohl RhoH-defiziente Mäuse eine normale Mastzelldifferenzierung zeigten, wurde eine Beeinträchtigung der Fc ϵ RI-abhängigen Degranulation und Zytokin-Produktion in RhoH-defizienten Mastzellen festgestellt [22]. Ursächlich ist hierfür ein Defekt in der Syk-Aktivierung dieser Zellen. Um die Defekte in der Degranulation RhoH-defizienter Mastzellen zu bestätigen, wurde die Menge an freigesetzter Hexosaminidase, einem Bestandteil der Mastzell-Granula, bestimmt. Neben der IgE-vermittelten Degranulation wurde auch die TLR-abhängige Hexosaminidase-Freisetzung analysiert. Eine TLR-abhängige Degranulation wurde bereits in früheren Studien beobachtet [64, 71]. Allerdings ist der Mechanismus der TLR-induzierten Degranulation noch weitgehend unerforscht. RhoH-defiziente Mastzellen zeigten neben einer Hemmung der IgE-vermittelten Degranulation, auch eine Beeinträchtigung der P3C-induzierten Hexosaminidase-Freisetzung (Abbildung 8A). Andere TLR-Liganden wie LPS oder CpG waren nicht in der Lage eine Degranulation dieser Zellen hervorzurufen, obwohl die entsprechenden Rezeptoren (TLR-4 und TLR-9) in Mastzellen nachgewiesen wurden (Abbildung 8B). Da sowohl Fc ϵ RI- als auch TLR-vermittelte Signalkaskaden eine Degranulation und Zytokin-Freisetzung hervorrufen, ist es möglich, dass in Mastzellen beide Signalwege miteinander vernetzt sind. Eine solche

Vernetzung könnte über die Tyrosinkinase Syk stattfinden, die in Mastzellen über einen RhoH-abhängigen Mechanismus aktiviert wird. Dies würde erklären, warum RhoH in Mastzellen für beide Signalwege benötigt wird.

Da sich Mastzellen vor allem an Körperbereichen ansiedeln, die in ständigem Kontakt mit der Außenwelt stehen, ist es sehr wahrscheinlich, dass sie auch maßgeblich an der Einleitung einer Immunantwort beteiligt sind. Eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems erfordert die Fähigkeit zur Erkennung von Pathogenen über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren, wie den Toll-like Rezeptoren und die anschließende Rekrutierung von Immunzellen über freigesetzte Zytokine. Dabei spielen vor allem TLR-2 und TLR-4 eine wichtige Rolle bei der Zytokin-Induktion durch Gram-positive und Gram-negative Bakterien. Beide Rezeptoren konnten in Knochenmarks-generierten Mastzellen nachgewiesen werden (Abbildung 8B). Auch wenn die Expression der Toll-like Rezeptoren in Mastzellen etwas geringer ausfiel als in Makrophagen, so sollte die Menge doch ausreichen um eine angemessene Immunantwort zu induzieren. In Makrophagen sind zwei verschiedene TLR-Adapter Moleküle, MyD88 und TRIF, an der Signalweiterleitung von TLR-4 beteiligt. Während der Signalweg über MyD88 eine Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen hervorruft, führt der TRIF-abhängige Signalweg zur Produktion von Typ I Interferonen. Im Gegensatz zu Makrophagen sind murine Mastzellen, die aus dem Knochenmark generiert wurden, nicht in der Lage Typ I Interferone herzustellen [81]. Dieser Defekt lässt sich vermutlich auf die Abwesenheit von Membran-gebundenem CD14 sowie auf eine verminderte TRAM-Expression dieser Zellen zurückführen. Da auch die MyD88-abhängige Signaltransduktion muriner Mastzellen durch einen Mangel an Signalmolekülen beeinträchtigt sein könnte, wurden Mastzellen auf die Expression wichtiger TLR-Signalmoleküle hin untersucht und die Ergebnisse mit Makrophagen verglichen. Neben der Expression von MyD88 und IRAK-1, wichtigen Molekülen im TLR-Signalweg von Makrophagen, wurde auch die Expression von CARD-11 (CARMA1) und Bcl-10 untersucht. Der Bcl-10/MALT1-Komplex, welcher durch CARD-11 aktiviert werden kann, spielt in Mastzellen eine wichtige Rolle bei der IgE-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B [86, 87]. Möglicherweise nutzen Mastzellen diesen Komplex jedoch auch zur TLR-vermittelten Zytokin-Produktion. So wurde ein Zusammenhang zwischen dem TLR-Signalweg und Bcl-10 für marginale B-Zellen prognostiziert [88]. Während Mastzellen und Makrophagen keine Unterschiede in der MyD88-, IRAK-1- und CARD-11-Expression zeigten, konnte eine erhöhte Bcl-10-Expression in Makrophagen nachgewiesen werden (Abbildung 9). Da Bcl-10 jedoch in erster Linie ein wichtiger Bestandteil des Fc ϵ RI-

Signalwegs ist, der in Knochenmarks-generierten Mastzellen nicht gestört ist, kann dieser Unterschied vernachlässigt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die MyD88-abhängige Signaltransduktion von Mastzellen nicht durch eine veränderte Ausstattung an TLR-Signalmolekülen beeinträchtigt ist. Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. So liegen beispielsweise keine Daten zur IRAK-2-, IRAK-4- und TRAF6-Expression dieser Zellen vor. Hierfür wäre eine DIGE (Differential in Gel Electrophoresis)-Analyse hilfreich. Für wt und RhoH-defiziente Mastzellen wurde bereits eine solche Analyse durchgeführt. Dabei wurde eine große Anzahl an unterschiedlich exprimierten Proteinen gefunden, die aber noch in der Massenspektrometrie analysiert werden müssen.

Nach der Bindung von Toll-like Rezeptoren an pathogene Strukturen, wird eine Signalkaskade eingeleitet, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B führt. Über NF κ B wird die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF reguliert. Um den TLR-Signalweg RhoH-defizienter Mastzellen zu untersuchen, wurden die Zellen für gewöhnlich mit dem TLR-4-Liganden LPS stimuliert. Neben einer defekten Degranulation, zeigten RhoH-defiziente Mastzellen auch eine Hemmung der IL-6- und TNF-Freisetzung nach LPS-Stimulation (Abbildung 10). Eine defekte Zytokin-Freisetzung kann sowohl auf eine verminderte Exozytose-Aktivität der RhoH-defizienten Zellen, als auch auf einen Synthese-Defekt zurückzuführen sein. Um herauszufinden, ob die verminderte Zytokin-Produktion RhoH-defizienter Mastzellen auf einem Synthese-Defekt beruht, wurde im nächsten Schritt die Menge an gebildeter IL-6 und TNF mRNA bestimmt. RhoH-defiziente Mastzellen zeigten sowohl nach LPS- als auch nach P3C-Stimulation eine Beeinträchtigung der IL-6 und TNF mRNA-Produktion (Abbildung 11). Somit kann man davon ausgehen, dass in diesen Zellen ein Synthese-Defekt vorliegt. Ursächlich könnten hierfür eine verminderte Transkriptionsaktivität sowie ein erhöhter RNA turnover sein. Den RNA turnover kann man bestimmen, indem man die Transkription mittels Actinomycin D hemmt und anschließend den RNA-Abbau analysiert. Da die Unterschiede in der Zytokin-Produktion im ELISA deutlicher zu sehen waren als auf RNA-Ebene, ist es außerdem möglich, dass neben der Synthese auch die Zytokin-Freisetzung RhoH-defizienter Mastzellen beeinträchtigt ist. In dieser Arbeit habe ich mich jedoch auf die Untersuchung der Synthese-Defekte beschränkt.

Um herauszufinden, ob die defekte Zytokin-Produktion RhoH-defizienter Mastzellen auf eine verminderte Transkriptionsaktivität dieser Zellen zurückzuführen ist, wurde als nächstes die NF κ B-Aktivierung RhoH-defizienter Mastzellen untersucht. Dazu wurde die Degradation des inhibitorischen Proteins I κ B α im WB analysiert. In unstimulierten Zellen bildet I κ B α

Komplexe mit den NF κ B-Heterodimeren p50/RelA, p50/RelB und p50/c-Rel aus und verhindert somit deren Kerntransport. Nach TLR-Stimulation kommt es jedoch zu einer Phosphorylierung von I κ B α durch die Kinasen IKK α , IKK β und IKK γ . Da phosphoryliertes I κ B α abgebaut wird, kann NF κ B anschließend ungehindert den Zellkern passieren. Mastzellen von wt Mäusen zeigten eine Degradation von I κ B α nach 60-minütiger LPS-Stimulation (Abbildung 12). In RhoH-defizienten Mastzellen wurde dagegen keine I κ B α -Degradation in diesem Zeitraum beobachtet. Somit lässt sich die verminderte Zytokin-Produktion RhoH-defizienter Mastzellen vermutlich auf eine Beeinträchtigung der NF κ B-Aktivierung dieser Zellen zurückführen. Da bereits die I κ B α -Degradation gehemmt ist, sollte die Kerntranslokation aller NF κ B-Heterodimere gleichermaßen beeinträchtigt sein. Um eine eindeutige Aussage treffen zu können müsste man jedoch die DNA-Bindung der einzelnen Heterodimere im EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) untersuchen.

Da die Effektivität der TLR-Signaltransduktion unter anderem von der Menge an exprimierten Toll-like Rezeptoren abhängt, wurde im nächsten Schritt die TLR-Expression von wt Zellen mit der TLR-Expression von RhoH-defizienten Mastzellen verglichen. Dabei wäre es nicht das erste Mal, dass RhoH einen Signalweg über die Menge an exprimierten Rezeptoren beeinflusst. So wurde für RhoH-überexprimierende B-Zellen gezeigt, dass eine verminderte CD123-Expression mit einer Beeinträchtigung der IL-3-vermittelten STAT5-Aktivierung dieser Zellen einhergeht [82]. Im Falle des TLR-Signalwegs könnte eine verminderte TLR-Expression zu einer Beeinträchtigung der NF κ B-Aktivierung RhoH-defizienter Mastzellen führen. Allerdings zeigten RhoH-defiziente Mastzellen statt einer verminderten sogar eine erhöhte TLR-Expression (Abbildung 13). Dies wurde für TLR-2, TLR-4, TLR-6, TLR-9 und MD-2, dem Co-Rezeptor für TLR-4, auf RNA-Ebene gezeigt (Abbildung 13A). Die Unterschiede der TLR-4- und TLR-9-Expression konnten mittels FACS-Analyse auch auf Proteinebene bestätigt werden (Abbildung 13B). Somit kann die defekte NF κ B-Aktivierung RhoH-defizienter Mastzellen nicht durch eine verminderte TLR-Expression dieser Zellen erklärt werden. Vielmehr scheinen RhoH-defiziente Mastzellen einen Feedback-Loop zu induzieren der zu einer erhöhten TLR-Expression führt.

Wichtige TLR-exprimierende Zellen sind Makrophagen. Als Zellen des angeborenen Immunsystems sind sie maßgeblich an der Einleitung einer Immunantwort beteiligt. So setzen sie nach TLR-Stimulation eine Reihe von Zytokinen frei, die wiederum andere Immunzellen an den Entzündungsherd locken. Bisher wurde RhoH nur in T-Zellen, B-Zellen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten nachgewiesen [13-15]. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass RhoH auch von murinen Makrophagen exprimiert wird

(Abbildung 14). Dabei wurden ähnliche Mengen an RhoH mRNA in primären Makrophagen und primären Mastzellen gefunden. Die Makrophagen-Zelllinie Raw 264.7 zeigte dagegen eine vergleichsweise geringe RhoH-Expression. Da RhoH konstitutiv aktiv ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Expression streng reguliert wird um selektive Funktionen zu ermöglichen. So konnte in neutrophilen Granulozyten eine Korrelation der RhoH-Induktion mit einer Hemmung der GM-CSF-vermittelten Leukotrien-Produktion gefunden werden [23]. Tatsächlich konnte in der hier vorliegenden Arbeit auch eine Regulation der RhoH-Expression nach TLR-Stimulation beobachtet werden (Abbildung 15). Die Signaltransduktion von Toll-like Rezeptoren erfolgt über die TLR-Adapter-Moleküle MyD88 (TLR-5, TLR-7, TLR-8, TLR-9), TRIF (TLR-3), MyD88 und Mal (TLR-2, TLR-4) oder TRIF und TRAM (TLR-4) [44, 48-53]. Um diese Signalwege miteinander vergleichen zu können wurden Makrophagen mit verschiedenen TLR-Liganden wie LPS (TLR-4), P3C (TLR-2), CpG (TLR-9), PIC (TLR-3) und R848 (TLR-7, TLR-8) stimuliert. Obwohl alle getesteten TLR-Liganden in der Lage waren die mRNA-Produktion von RhoH zu hemmen, gab es Unterschiede in den jeweiligen Kinetiken. Die Stimulation von TLR-3 und TLR-4, deren Signaltransduktion über TRIF abläuft, verursachte eine sehr schnelle und kurze Hemmung der RhoH-Expression. Dagegen führte die Stimulation von TLR-2, TLR-7/8 und TLR-9, Rezeptoren die MyD88 als Adapter-Molekül verwenden, zu einer späteren Inhibition der RhoH-Expression. Die Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass Unterschiede in den Kinetiken auf Unterschiede in den beteiligten TLR-Adaptermolekülen zurückzuführen sind. Allerdings könnten auch Unterschiede in der subzellularen Lokalisation der Toll-like Rezeptoren den beobachteten Effekt hervorrufen. Möglicherweise müssen extrazelluläre Toll-like Rezeptoren internalisiert werden um die RhoH-Expression zu beeinflussen. Dies würde erklären, warum mit dem TLR-2-Liganden P3C erst nach 8-stündiger Stimulation ein Minimum der RhoH-Expression erreicht wird. Die Repression von RhoH könnte möglicherweise über den Transkriptionsfaktor AP-1 erfolgen. AP-1 kann durch TLR-Liganden aktiviert werden. Außerdem wurde bereits gezeigt, dass JunD, ein Bestandteil von AP-1, die RhoH-Expression in Raji- und AML-Zellen hemmt [89]. Ob JunD auch die RhoH-Expression muriner Makrophagen inhibiert, könnte mittels ChiP (Chromatin Immunoprecipitation)-Analyse überprüft werden.

Obwohl RhoH eine wichtige Rolle im BCR- und FcεRI-Signalweg spielt, wurde keine Beeinträchtigung der B-Zell oder Mastzell-Entwicklung in RhoH-defizienten Mäusen beobachtet [18, 22]. Um herauszufinden, ob RhoH die Differenzierung von Makrophagen beeinflusst, wurden Knochenmarks-generierte Makrophagen, nach 1-wöchiger

Differenzierung in M-CSF-haltigem Medium (L929-Überstände), auf die Expression Makrophagen-spezifischer Marker hin untersucht. Als Marker dienten der Komplementrezeptor 3 (CD11b) und F4/80. FACS-Analysen zeigten, dass eine Woche nach Differenzierung sowohl wt als auch RhoH-defiziente Makrophagen komplett CD11b und F4/80 positiv waren (Abbildung 16A). Somit scheint die Makrophagendifferenzierung RhoH-defizienter Mäuse nicht beeinträchtigt zu sein. Neben CD11b und F4/80 wurde außerdem die Expression von CD80, CD40 und MHC-II in wt und RhoH-defizienten Makrophagen bestimmt. Sowohl wt als auch RhoH-defiziente Makrophagen zeigten eine Induktion der CD80-, CD40- und MHC-II-Expression nach LPS-Stimulation (Abbildung 16B). Dies ist ein Hinweis darauf, dass RhoH-defiziente Makrophagen ihre Funktion bei der Einleitung einer Immunantwort erfüllen können.

Als nächstes wurde untersucht, ob RhoH den TLR-Signalweg von Makrophagen auf ähnliche Weise beeinflusst wie den TLR-Signalweg von Mastzellen. Neben der IL-6- und TNF-Induktion wurde in Makrophagen zusätzlich die Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12p40 und des inhibitorischen Zytokins IL-10 untersucht. Eine Immunreaktion dient in erster Linie der Beseitigung von Krankheitserregern, die in den Körper eingedrungen sind. Dabei besteht jedoch die Gefahr, dass neben den Pathogenen auch körpereigene Zellen geschädigt werden. Aus diesem Grund muss die Immunreaktion streng kontrolliert werden. Nur ein Gleichgewicht von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen ermöglicht eine angemessene Immunantwort. Überraschenderweise wurde in RhoH-defizienten Makrophagen eine verstärkte Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF und IL-12p40 beobachtet (Abbildung 17). Außerdem konnte eine erhöhte NF κ B-Aktivität in diesen Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 18). Dagegen wurde eine Beeinträchtigung der IL-10-Produktion in RhoH-defiziente Makrophagen festgestellt (Abbildung 17). Auf Grund des Ungleichgewichts an pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, kann man vermuten, dass RhoH-defiziente Makrophagen bei der Pathogen-Bekämpfung eine wirtsschädigende Immunreaktion hervorrufen. Interessant wäre zu erfahren, wie sich RhoH-defiziente Makrophagen im Krankheitsmodell verhalten.

Um zu überprüfen, ob die verstärkte NF κ B-Aktivierung RhoH-defizienter Makrophagen auf eine erhöhte TLR-Expression dieser Zellen zurückzuführen ist, wurde die basale TLR-2- und TLR-4-Expression von wt und RhoH-defizienten Makrophagen analysiert. Eine erhöhte TLR-Expression, wie sie in RhoH-defizienten Mastzellen zu finden ist, konnte in RhoH-defizienten Makrophagen jedoch nicht nachgewiesen werden. Stattdessen wurde eine verminderte TLR-2-Expression in diesen Zellen gefunden (Abbildung 20). Da eine verminderte TLR-2-

Expression jedoch nicht die erhöhte IL-6-, TNF- und IL-12p40-Produktion RhoH-defizienter Makrophagen erklären kann, muss RhoH unterhalb des Toll-like Rezeptors aber oberhalb von NFκB in den TLR-Signalweg von Makrophagen eingreifen. Warum RhoH die TLR-Expression von Mastzellen und Makrophagen auf unterschiedliche Weise beeinflusst ist aus den vorliegenden Daten nicht ersichtlich. Allerdings ist schon aus früheren Studien anderer Arbeitsgruppen bekannt, dass sich der TLR-Signalweg von Mastzellen grundsätzlich vom TLR-Signalweg der Makrophagen unterscheidet. So findet beispielsweise in Mastzellen keine TRIF-abhängige Typ I Interferon Produktion statt [81]. Somit ist es nicht unwahrscheinlich, dass auch die TLR-Expression von Mastzellen und Makrophagen über verschiedene Mechanismen reguliert wird.

In Mastzellen wurde gezeigt, dass RhoH die FcεRI-vermittelte Zytokin-Produktion über einen Syk-abhängigen Mechanismus reguliert [22]. Syk ist eine Tyrosinkinase, die in erster Linie an der Signaltransduktion des Fc Rezeptors sowie des B-Zell Rezeptors beteiligt ist. Neuere Studien deuten jedoch darauf hin, dass Syk auch eine wichtige Rolle in TLR-vermittelten Signalkaskaden spielt. So wurde gezeigt, dass Syk in der Monozyten-Zelllinie THP-1 für die Tyrosin-Phosphorylierung von TLR-4 benötigt wird [83]. Eine solche Phosphorylierung scheint Voraussetzung für die LPS-abhängige NFκB-Aktivierung und Zytokin-Produktion zu sein [85]. Außerdem scheint Syk in murinen Makrophagen einen negativen Feedback-Mechanismus der pro-inflammatorischen Zytokin-Produktion zu induzieren [84]. Syk kann durch verschiedene TLR-Liganden aktiviert werden. So wurde eine Phosphorylierung des Tyrosin-Rests 352 nach LPS-, PIC-, und CpG-Stimulation beobachtet [84]. Neben dem Tyrosin-Rest 352 besitzt Syk noch eine weitere aktivierende Phosphorylierungsstelle, die bei der Maus durch die Tyrosin-Reste 519/520 gekennzeichnet ist. Eine Aktivierung dieser beiden Tyrosin-Reste durch den FcεRI erfordert die Expression von RhoH [22]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die LPS-Stimulation von murinen Makrophagen eine Phosphorylierung der Tyrosin-Reste 519/520 hervorruft (Abbildung 22). RhoH-defiziente Makrophagen zeigten dagegen keine LPS-abhängige Syk-Aktivierung. Allerdings wurde eine Voraktivierung von Syk in RhoH-defizienten Makrophagen beobachtet. Diese verschwand jedoch bereits nach 5-minütiger LPS-Stimulation. Da sowohl die FcεRI- als auch die TLR-vermittelte Syk-Aktivierung RhoH-abhängig verläuft, muss der Voraktivierung RhoH-defizienter Makrophagen ein anderer Mechanismus zu Grunde liegen. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass RhoH in erster Linie für die Rekrutierung und den Transport der Tyrosinkinasen Syk und Zap70 an den jeweiligen Rezeptorkomplex benötigt wird [18, 22]. Um den Einfluss von Syk auf die TLR-vermittelte Zytokin-Produktion von

Makrophagen zu untersuchen, wurde die Syk-Phosphorylierung mit Piceatannol gehemmt. Dabei zeigten Piceatannol-behandelte Zellen eine erhöhte IL-6- und TNF-Produktion bei einer gleichzeitigen Hemmung der IL-12p40- und IL-10-Produktion (Abbildung 23). Somit spiegelt die Syk-Inhibition zumindest teilweise den Phenotyp RhoH-defizienter Makrophagen wieder. Eine Ausnahme bildet dabei IL-12p40, welches von RhoH-defizienten Makrophagen verstärkt exprimiert wird, wohingegen die IL-12p40-Produktion durch Piceatannol gehemmt wird. Eine Inhibition der IL-12p40- und IL-10-Produktion durch Piceatannol wurde bereits für THP-1 Zellen beschrieben [83]. Studien mit Syk-defizienten Makrophagen zeigten dagegen eine erhöhte IL-6-, TNF-, und IL-12p40-Produktion in Abwesenheit von Syk [90]. Wahrscheinlich sind die Studien über das Verhalten Syk-defizienter Makrophagen im TLR-Signalweg verlässlicher als die Piceatannol-Daten. Laut Hersteller blockiert Piceatannol selektiv die FcεRI-vermittelte Syk-Aktivierung von RBL-2H3 Zellen. Es ist also nicht auszuschließen, dass der Inhibitor in anderen Zellen unspezifische Nebeneffekte aufweist. Deshalb wäre ein direkter Vergleich von RhoH- und Syk-defizienten Mäusen hilfreich. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass RhoH den TLR-Signalweg von Makrophagen über einen Syk-abhängigen Mechanismus moduliert. So konnte gezeigt werden, dass Syk in murinen Makrophagen nach LPS-Stimulation in einem RhoH-abhängigen Prozess aktiviert wird und dass eine Inhibition von Syk zumindest teilweise den Phenotyp RhoH-defizienter Makrophagen widerspiegelt.

Frühere Studien haben gezeigt, dass die Phosphorylierung von TLR-4 Voraussetzung für die NFκB-abhängige Zytokin-Produktion ist und dass Syk eine solche Phosphorylierung induziert [83, 85]. Trotzdem zeigten RhoH-defiziente Makrophagen, die einen Defekt der LPS-abhängigen Syk-Aktivierung aufweisen, eine verstärkte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen nach LPS-Stimulation. Daher ist es möglich, dass andere Kinasen die Rolle von Syk in der TLR-4-Phosphorylierung dieser Zellen übernehmen. Deshalb wurde untersucht, wie sich eine allgemeine Inhibition von Src-Kinasen auf die LPS-vermittelte Zytokin-Produktion von Makrophagen auswirkt. Zur Inhibition der Src-Kinasen wurden die beiden Inhibitoren PP1 (für Lck, Fyn, Hck und Src) und PP2 (für Lck, Fyn und Hck) verwendet. Sowohl PP1 als auch PP2 blockierten die gesamte Zytokin-Produktion muriner Makrophagen (Abbildung 24). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass tatsächlich neben Syk noch andere Kinasen an der TLR-Signaltransduktion von Makrophagen beteiligt sind.

Insgesamt scheint die Funktion von RhoH im TLR-Signalweg von Mastzellen und Makrophagen vielfältig zu sein (Abbildung 25).

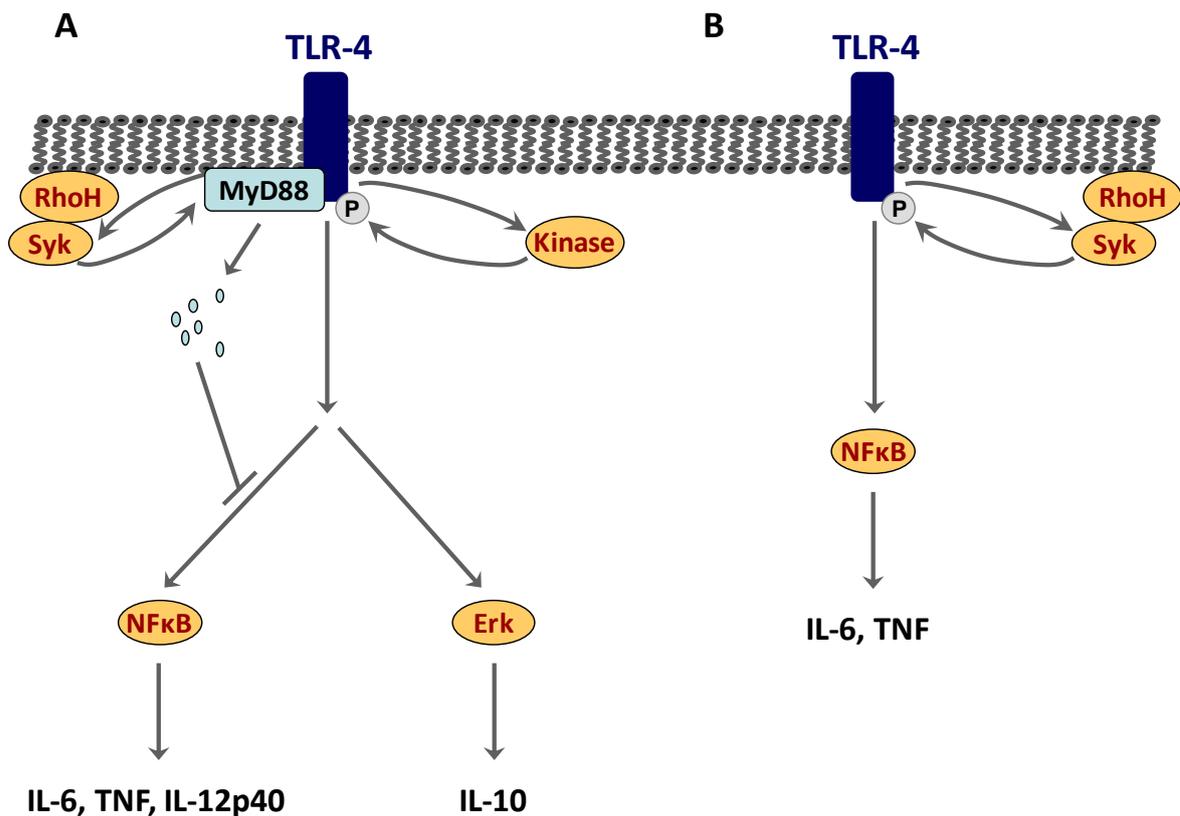


Abbildung 25: Modell der TLR-vermittelten Signaltransduktion von Makrophagen (A) und Mastzellen (B). **A:** In Makrophagen transportiert RhoH die Tyrosinkinase Syk an den Toll-like Rezeptor, wo diese dann aktiviert wird. Syk wiederum induziert, durch Phosphorylierung und Degradation des TLR-Adapter-Moleküls MyD88, einen negativen Feedbackmechanismus der pro-inflammatorischen Zytokin-Produktion. **B:** Auch in Mastzellen wird Syk über RhoH an den Toll-like Rezeptor transportiert. Allerdings wird Syk in diesen Zellen für die Phosphorylierung des Toll-like Rezeptors benötigt. Ohne eine solche Phosphorylierung kann keine Signaltransduktion stattfinden.

Während RhoH eine essentielle Rolle in der Zytokin-Produktion von Mastzellen spielt, scheint die Rho-GTPase in Makrophagen einen negativen Feedbackmechanismus der pro-inflammatorischen Zytokin-Produktion zu induzieren. Dieser lässt sich vermutlich auf eine Syk-abhängige Phosphorylierung und Degradation des TLR-Adaptermoleküls MyD88 zurückführen [84]. So konnte gezeigt werden, dass Syk in Makrophagen durch LPS aktiviert wird und dass diese Aktivierung eine RhoH-Expression erfordert. Außerdem konnte durch Syk-Inhibition, zumindest teilweise, der Phänotyp RhoH-defizienter Makrophagen wiedergespiegelt werden. Auf Grund der defekten Syk-Aktivierung ist es sehr wahrscheinlich, dass RhoH-defiziente Makrophagen noch weitere Funktionsstörungen aufweisen. So spielt Syk in Makrophagen auch eine wichtige Rolle in der FcγR-vermittelten Phagozytose und Signaltransduktion [91]. Außerdem stellt sich die Frage, wie sich eine RhoH-Defizienz auf andere TLR-vermittelte Funktionen auswirkt. So könnte auch die TLR-induzierte Phagozytose oder Autophagie durch RhoH beeinflusst sein. Der Grund für die defekte

Zytokin-Produktion RhoH-defizienter Mastzellen liegt wahrscheinlich in einer Beeinträchtigung der TLR-Phosphorylierung dieser Zellen. Dagegen kann die TLR-Phosphorylierung in Makrophagen möglicherweise von anderen Kinasen übernommen werden. Diese Hypothese wird durch die PP1- und PP2-Daten unterstützt. So führte die Inhibition der Src-Kinasen, mittels PP1 und PP2, in Makrophagen zu einer kompletten Hemmung der Zytokin-Produktion. Dagegen hatte eine Syk-Inhibition durch Piceatannol eine verstärkte IL-6- und TNF-Produktion dieser Zellen zur Folge. Da RhoH konstitutiv aktiv ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Expression streng reguliert wird um selektive Funktionen zu ermöglichen. Tatsächlich konnte in der hier vorliegenden Arbeit eine Regulation der RhoH-Expression nach TLR-Stimulation beobachtet werden. Somit scheint RhoH ein molekularer Schalter zu sein, der die TLR-vermittelte Immunantwort von Mastzellen und Makrophagen durch einen Syk-abhängigen Mechanismus reguliert.

7 Literatur

- 1 **Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K. L. and Der, C. J.,** Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* 2010. **10:** 842-857.
- 2 **Hall, A.,** Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998. **279:** 509-514.
- 3 **Caron, E. and Hall, A.,** Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 1998. **282:** 1717-1721.
- 4 **Chimini, G. and Chavrier, P.,** Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat Cell Biol* 2000. **2:** E191-196.
- 5 **Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R. L. and Hahn, K. M.,** Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* 2006. **440:** 1069-1072.
- 6 **Aspenstrom, P., Fransson, A. and Saras, J.,** Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* 2004. **377:** 327-337.
- 7 **Tybulewicz, V. L. and Henderson, R. B.,** Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 2009. **9:** 630-644.
- 8 **Cox, D., Chang, P., Zhang, Q., Reddy, P. G., Bokoch, G. M. and Greenberg, S.,** Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J Exp Med* 1997. **186:** 1487-1494.
- 9 **Guillemot, J. C., Montcourrier, P., Vivier, E., Davoust, J. and Chavrier, P.,** Selective control of membrane ruffling and actin plaque assembly by the Rho GTPases Rac1 and CDC42 in FcepsilonRI-activated rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *J Cell Sci* 1997. **110 (Pt 18):** 2215-2225.
- 10 **Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez-Perez, I., Bravo, R. and Lacal, J. C.,** Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* 1997. **11:** 463-475.
- 11 **Fueller, F. and Kubatzky, K. F.,** The small GTPase RhoH is an atypical regulator of haematopoietic cells. *Cell Commun Signal* 2008. **6:** 6.
- 12 **Preudhomme, C., Roumier, C., Hildebrand, M. P., Dallery-Prudhomme, E., Lantoine, D., Lai, J. L., Daudignon, A., Adenis, C., Bauters, F., Fenaux, P., Kerckaert, J. P. and Galiegue-Zouitina, S.,** Nonrandom 4p13 rearrangements of the RhoH/TTF gene, encoding a GTP-binding protein, in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma. *Oncogene* 2000. **19:** 2023-2032.
- 13 **Gu, Y., Jasti, A. C., Jansen, M. and Sieftring, J. E.,** RhoH, a hematopoietic-specific Rho GTPase, regulates proliferation, survival, migration, and engraftment of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2005. **105:** 1467-1475.
- 14 **Schmidt-Mende, J., Geering, B., Yousefi, S. and Simon, H. U.,** Lysosomal degradation of RhoH protein upon antigen receptor activation in T but not B cells. *Eur J Immunol* 2010. **40:** 525-529.
- 15 **Lahousse, S., Smorowski, A. L., Denis, C., Lantoine, D., Kerckaert, J. P. and Galiegue-Zouitina, S.,** Structural features of hematopoiesis-specific RhoH/ARHH gene: high diversity of 5'-UTR in different hematopoietic lineages suggests a complex post-transcriptional regulation. *Gene* 2004. **343:** 55-68.
- 16 **Li, X., Bu, X., Lu, B., Avraham, H., Flavell, R. A. and Lim, B.,** The hematopoiesis-specific GTP-binding protein RhoH is GTPase deficient and modulates activities of other Rho GTPases by an inhibitory function. *Mol Cell Biol* 2002. **22:** 1158-1171.
- 17 **Chae, H. D., Lee, K. E., Williams, D. A. and Gu, Y.,** Cross-talk between RhoH and Rac1 in regulation of actin cytoskeleton and chemotaxis of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2008. **111:** 2597-2605.

- 18 **Gu, Y., Chae, H. D., Sieftring, J. E., Jasti, A. C., Hildeman, D. A. and Williams, D. A.**, RhoH GTPase recruits and activates Zap70 required for T cell receptor signaling and thymocyte development. *Nat Immunol* 2006. **7**: 1182-1190.
- 19 **Dorn, T., Kuhn, U., Bungartz, G., Stiller, S., Bauer, M., Ellwart, J., Peters, T., Scharffetter-Kochanek, K., Semmrich, M., Laschinger, M., Holzmann, B., Klinkert, W. E., Straten, P. T., Kollgaard, T., Sixt, M. and Brakebusch, C.**, RhoH is important for positive thymocyte selection and T-cell receptor signaling. *Blood* 2007. **109**: 2346-2355.
- 20 **Chae, H. D., Sieftring, J. E., Hildeman, D. A., Gu, Y. and Williams, D. A.**, RhoH Regulates Subcellular Localization of ZAP-70 and Lck in T Cell Receptor Signaling. *PLoS One* 2010. **5**: e13970.
- 21 **Matsumoto, M., Oyamada, K., Takahashi, H., Sato, T., Hatakeyama, S. and Nakayama, K. I.**, Large-scale proteomic analysis of tyrosine-phosphorylation induced by T-cell receptor or B-cell receptor activation reveals new signaling pathways. *Proteomics* 2009. **9**: 3549-3563.
- 22 **Oda, H., Fujimoto, M., Patrick, M. S., Chida, D., Sato, Y., Azuma, Y., Aoki, H., Abe, T., Suzuki, H. and Shirai, M.**, RhoH plays critical roles in FcepsilonRI-dependent signal transduction in mast cells. *J Immunol* 2009. **182**: 957-962.
- 23 **Daryadel, A., Yousefi, S., Troi, D., Schmid, I., Schmidt-Mende, J., Mordasini, C., Dahinden, C. A., Ziemiecki, A. and Simon, H. U.**, RhoH/TTF negatively regulates leukotriene production in neutrophils. *J Immunol* 2009. **182**: 6527-6532.
- 24 **Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R. S., Kuppers, R. and Dalla-Favera, R.**, Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001. **412**: 341-346.
- 25 **Galiegue-Zouitina, S., Delestre, L., Dupont, C., Troussard, X. and Shelley, C. S.**, Underexpression of RhoH in Hairy Cell Leukemia. *Cancer Res* 2008. **68**: 4531-4540.
- 26 **Iwasaki, T., Katsumi, A., Kiyoi, H., Tanizaki, R., Ishikawa, Y., Ozeki, K., Kobayashi, M., Abe, A., Matsushita, T., Watanabe, T., Amano, M., Kojima, T., Kaibuchi, K. and Naoe, T.**, Prognostic implication and biological roles of RhoH in acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol* 2008. **81**: 454-460.
- 27 **Pluddemann, A., Mukhopadhyay, S. and Gordon, S.**, Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. *Immunol Rev* 2011. **240**: 11-24.
- 28 **Anderson, K. V., Bokla, L. and Nusslein-Volhard, C.**, Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985. **42**: 791-798.
- 29 **Stein, D. and Nusslein-Volhard, C.**, Multiple extracellular activities in Drosophila egg perivitelline fluid are required for establishment of embryonic dorsal-ventral polarity. *Cell* 1992. **68**: 429-440.
- 30 **Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A.**, The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 1996. **86**: 973-983.
- 31 **Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C. A., Jr.**, A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997. **388**: 394-397.
- 32 **Krishnan, J., Selvarajoo, K., Tsuchiya, M., Lee, G. and Choi, S.**, Toll-like receptor signal transduction. *Exp Mol Med* 2007. **39**: 421-438.
- 33 **Kim, H. M., Park, B. S., Kim, J. I., Kim, S. E., Lee, J., Oh, S. C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O. J. and Lee, J. O.**, Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 2007. **130**: 906-917.

- 34 **Jin, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S. G., Lee, H. and Lee, J. O.**, Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 2007. **130**: 1071-1082.
- 35 **Bell, J. K., Botos, I., Hall, P. R., Askins, J., Shiloach, J., Segal, D. M. and Davies, D. R.**, The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005. **102**: 10976-10980.
- 36 **Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., Hood, L. E. and Aderem, A.**, The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005. **102**: 9577-9582.
- 37 **Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L. and Aderem, A.**, The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000. **97**: 13766-13771.
- 38 **Farhat, K., Riekenberg, S., Heine, H., Debarry, J., Lang, R., Mages, J., Buwitt-Beckmann, U., Roschmann, K., Jung, G., Wiesmuller, K. H. and Ulmer, A. J.**, Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J Leukoc Biol* 2008. **83**: 692-701.
- 39 **Nakao, Y., Funami, K., Kikkawa, S., Taniguchi, M., Nishiguchi, M., Fukumori, Y., Seya, T. and Matsumoto, M.**, Surface-expressed TLR6 participates in the recognition of diacylated lipopeptide and peptidoglykan in human cells. *J Immunol* 2005. **174**: 1566-1573.
- 40 **Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B. S., Lee, H. and Lee, J. O.**, The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 2009. **458**: 1191-1195.
- 41 **Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. and Kimoto, M.**, MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999. **189**: 1777-1782.
- 42 **Nishitani, C., Takahashi, M., Mitsuzawa, H., Shimizu, T., Ariki, S., Matsushima, N. and Kuroki, Y.**, Mutational analysis of Cys(88) of Toll-like receptor 4 highlights the critical role of MD-2 in cell surface receptor expression. *Int Immunol* 2009. **21**: 925-934.
- 43 **Van Amersfoort, E. S., Van Berkel, T. J. and Kuiper, J.**, Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 2003. **16**: 379-414.
- 44 **Kawai, T. and Akira, S.**, TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006. **13**: 816-825.
- 45 **Jacchieri, S. G., Torquato, R. and Brentani, R. R.**, Structural study of binding of flagellin by Toll-like receptor 5. *J Bacteriol* 2003. **185**: 4243-4247.
- 46 **Dalpke, A., Frank, J., Peter, M. and Heeg, K.**, Activation of toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species. *Infect Immun* 2006. **74**: 940-946.
- 47 **McGettrick, A. F. and O'Neill, L. A.**, Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr Opin Immunol* 2010. **22**: 20-27.
- 48 **Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S. and Janeway, C. A., Jr.**, MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998. **2**: 253-258.
- 49 **Fitzgerald, K. A., Palsson-McDermott, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mansell, A. S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M. T., McMurray, D., Smith, D. E., Sims, J. E., Bird, T. A. and O'Neill, L. A.**, Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001. **413**: 78-83.
- 50 **Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K. and Akira, S.**, Essential

- role for TIRAP in activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002. **420**: 324-329.
- 51 **Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K. and Akira, S.**, Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002. **169**: 6668-6672.
- 52 **Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M. and Seya, T.**, TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 2003. **278**: 49751-49762.
- 53 **Vogel, S. N., Fitzgerald, K. A. and Fenton, M. J.**, TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv* 2003. **3**: 466-477.
- 54 **Bonizzi, G. and Karin, M.**, The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004. **25**: 280-288.
- 55 **Amin, K.**, The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med* 2012. **106**: 9-14.
- 56 **Gurish, M. F., Bryce, P. J., Tao, H., Kisselgof, A. B., Thornton, E. M., Miller, H. R., Friend, D. S. and Oettgen, H. C.**, IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. *J Immunol* 2004. **172**: 1139-1145.
- 57 **Befus, D.**, Immunity in intestinal helminth infections: present concepts, future directions. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986. **80**: 735-741.
- 58 **Moreau, E. and Chauvin, A.**, Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *J Biomed Biotechnol* 2010. **2010**: 428593.
- 59 **Crivellato, E. and Ribatti, D.**, The mast cell: an evolutionary perspective. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2010. **85**: 347-360.
- 60 **McCurdy, J. D., Lin, T. J. and Marshall, J. S.**, Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *J Leukoc Biol* 2001. **70**: 977-984.
- 61 **Pietrzak, A., Wierzbicki, M., Wiktorska, M. and Brzezinska-Blaszczyk, E.**, Surface TLR2 and TLR4 Expression on Mature Rat Mast Cells Can Be Affected by Some Bacterial Components and Proinflammatory Cytokines. *Mediators Inflamm* 2011. **2011**: 427473.
- 62 **Applequist, S. E., Wallin, R. P. and Ljunggren, H. G.**, Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int Immunol* 2002. **14**: 1065-1074.
- 63 **Passante, E., Ehrhardt, C., Sheridan, H. and Frankish, N.**, RBL-2H3 cells are an imprecise model for mast cell mediator release. *Inflamm Res* 2009. **58**: 611-618.
- 64 **McCurdy, J. D., Olynych, T. J., Maher, L. H. and Marshall, J. S.**, Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J Immunol* 2003. **170**: 1625-1629.
- 65 **Varadaradjalou, S., Feger, F., Thieblemont, N., Hamouda, N. B., Pleau, J. M., Dy, M. and Arock, M.**, Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *Eur J Immunol* 2003. **33**: 899-906.
- 66 **Matsushima, H., Yamada, N., Matsue, H. and Shimada, S.**, TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* 2004. **173**: 531-541.
- 67 **Imajo, N., Kurihara, D., Fukuishi, N., Inukai, A., Matsushita, S., Noda, S., Toyoda, M., Yoshioka, M., Teruya, H., Nishii, Y., Matsui, N. and Akagi, M.**,

- Lipoteichoic acid improves the capability of mast cells in the host defense system against bacteria. *Inflamm Res* 2009. **58**: 797-807.
- 68 **Kubo, Y., Fukuishi, N., Yoshioka, M., Kawasoe, Y., Iriguchi, S., Imajo, N., Yasui, Y., Matsui, N. and Akagi, M.**, Bacterial components regulate the expression of Toll-like receptor 4 on human mast cells. *Inflamm Res* 2007. **56**: 70-75.
- 69 **Orinska, Z., Bulanova, E., Budagian, V., Metz, M., Maurer, M. and Bulfone-Paus, S.**, TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8+ T-cell recruitment. *Blood* 2005. **106**: 978-987.
- 70 **Yang, H., Wei, J., Zhang, H., Lin, L., Zhang, W. and He, S.**, Upregulation of Toll-like receptor (TLR) expression and release of cytokines from P815 mast cells by GM-CSF. *BMC Cell Biol* 2009. **10**: 37.
- 71 **Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Akira, S., Okumura, K., Ra, C. and Ogawa, H.**, Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest* 2002. **109**: 1351-1359.
- 72 **Masuda, A., Yoshikai, Y., Aiba, K. and Matsuguchi, T.**, Th2 cytokine production from mast cells is directly induced by lipopolysaccharide and distinctly regulated by c-Jun N-terminal kinase and p38 pathways. *J Immunol* 2002. **169**: 3801-3810.
- 73 **Leal-Berumen, I., Conlon, P. and Marshall, J. S.**, IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994. **152**: 5468-5476.
- 74 **Sutherland, R. E., Olsen, J. S., McKinstry, A., Villalta, S. A. and Wolters, P. J.**, Mast cell IL-6 improves survival from Klebsiella pneumonia and sepsis by enhancing neutrophil killing. *J Immunol* 2008. **181**: 5598-5605.
- 75 **Saturnino, S. F., Prado, R. O., Cunha-Melo, J. R. and Andrade, M. V.**, Endotoxin tolerance and cross-tolerance in mast cells involves TLR4, TLR2 and FcepsilonR1 interactions and SOCS expression: perspectives on immunomodulation in infectious and allergic diseases. *BMC Infect Dis* 2010. **10**: 240.
- 76 **Qiao, H., Andrade, M. V., Lisboa, F. A., Morgan, K. and Beaven, M. A.**, FcepsilonR1 and toll-like receptors mediate synergistic signals to markedly augment production of inflammatory cytokines in murine mast cells. *Blood* 2006. **107**: 610-618.
- 77 **Kasakura, K., Takahashi, K., Aizawa, T., Hosono, A. and Kaminogawa, S.**, A TLR2 ligand suppresses allergic inflammatory reactions by acting directly on mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2009. **150**: 359-369.
- 78 **Magerl, M., Lammel, V., Siebenhaar, F., Zuberbier, T., Metz, M. and Maurer, M.**, Non-pathogenic commensal Escherichia coli bacteria can inhibit degranulation of mast cells. *Exp Dermatol* 2008. **17**: 427-435.
- 79 **Karasuyama, H. and Melchers, F.**, Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur J Immunol* 1988. **18**: 97-104.
- 80 **Stanley, E. R. and Heard, P. M.**, Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *J Biol Chem* 1977. **252**: 4305-4312.
- 81 **Keck, S., Muller, I., Fejer, G., Savic, I., Tchaptchet, S., Nielsen, P. J., Galanos, C., Huber, M. and Freudenberg, M. A.**, Absence of Toll-IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN- β Signaling in Lipopolysaccharide-Stimulated Murine Mast Cells. *J Immunol* 2011.
- 82 **Gundogdu, M. S., Liu, H., Metzdorf, D., Hildebrand, D., Aigner, M., Aktories, K., Heeg, K. and Kubatzky, K. F.**, The haematopoietic GTPase RhoH modulates IL3 signaling through regulation of STAT activity and IL3 receptor expression. *Mol Cancer* 2010. **9**: 225.

-
- 83 **Chaudhary, A., Fresquez, T. M. and Naranjo, M. J.,** Tyrosine kinase Syk associates with toll-like receptor 4 and regulates signaling in human monocytic cells. *Immunol Cell Biol* 2007. **85**: 249-256.
- 84 **Han, C., Jin, J., Xu, S., Liu, H., Li, N. and Cao, X.,** Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nat Immunol* 2010. **11**: 734-742.
- 85 **Medvedev, A. E., Piao, W., Shoenfelt, J., Rhee, S. H., Chen, H., Basu, S., Wahl, L. M., Fenton, M. J. and Vogel, S. N.,** Role of TLR4 tyrosine phosphorylation in signal transduction and endotoxin tolerance. *J Biol Chem* 2007. **282**: 16042-16053.
- 86 **Klemm, S. and Ruland, J.,** Inflammatory signal transduction from the Fc epsilon RI to NF-kappa B. *Immunobiology* 2006. **211**: 815-820.
- 87 **Hara, H. and Saito, T.,** CARD9 versus CARMA1 in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2009. **30**: 234-242.
- 88 **Xue, L., Morris, S. W., Orihuela, C., Tuomanen, E., Cui, X., Wen, R. and Wang, D.,** Defective development and function of Bcl10-deficient follicular, marginal zone and B1 B cells. *Nat Immunol* 2003. **4**: 857-865.
- 89 **Delestre, L., Berthon, C., Quesnel, B., Figeac, M., Kerckaert, J. P., Galiegue-Zouitina, S. and Shelley, C.,** Repression of the RHOH gene by JunD. *Biochem J* 2011.
- 90 **Hamerman, J. A., Tchao, N. K., Lowell, C. A. and Lanier, L. L.,** Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12. *Nat Immunol* 2005. **6**: 579-586.
- 91 **Crowley, M. T., Costello, P. S., Fitzer-Attas, C. J., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V. L. and DeFranco, A. L.,** A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc gamma receptors on macrophages. *J Exp Med* 1997. **186**: 1027-1039.

8 Veröffentlichungen, Präsentationen und Stipendien

8.1 Veröffentlichungen

Gündogdu MS, Liu H, **Metzdorf D**, Hildebrand D, Aigner M, Aktories K, Heeg K, Kubatzky KF: The haematopoietic GTPase RhoH modulates IL3 signaling through regulation of STAT activity and IL3 receptor expression. Mol Cancer, 2010, 25;9:225.

8.2 Präsentationen

8.2.1 Vorträge

The haematopoietic GTPase RhoH is a molecular switch regulating the activation profile of immune cells; Mini Symposium “Crossroads in Immune Signaling”; NH Hotel Heidelberg, Deutschland; November 2011

8.2.2 Posterpräsentationen

Daniela Metzdorf, Klaus Heeg, Katharina F. Kubatzky: The haematopoietic GTPase RhoH is a molecular switch regulating the activation profile of immune cells; 15th Joint Meeting – Signal Transduction; Weimar, Deutschland; November 2011

Daniela Metzdorf, Klaus Heeg, Katharina F. Kubatzky: Regulation of TLR-Expression through the haematopoietic GTPase RhoH; Toll2011 – Decoding Innate Immunity; Riva del Garda, Italien; Mai 2011

Daniela Metzdorf, Mehtap Guendogdu, Klaus Heeg, Katharina F. Kubatzky: Regulation of TLR-Signaling through the haematopoietic GTPase RhoH; 40th Annual Meeting of the German Society for Immunology; Leipzig, Deutschland; September 2010

Daniela Metzdorf, Klaus Heeg, Katharina F. Kubatzky: Regulation of TLR-Expression through the haematopoietic GTPase RhoH; 14th Joint Meeting – Signal Transduction; Weimar, Deutschland; Oktober 2010

Daniela Metzdorf, Simone Reipschläger, Gudula Schmidt, Katharina F. Kubatzky: Cytotoxic Necrotising Factors differentially activate STAT proteins; 13th Joint Meeting – Signal Transduction; Weimar, Deutschland; Oktober 2009

8.3 Stipendien

Abschlussstipendium der Landesgraduierföderung; Januar – Juni 2012

Promotionsstipendium der Landesgraduierföderung für das Promotionsprogramm „Differentielle Aktivierung und Vernetzung von Signalmodulen innerhalb des Immunsystems“; November 2008 – Oktober 2011

Reisekostenstipendium von der Gesellschaft für Signaltransduktion für das 15. Joint Meeting – Signal Transduction; Weimar, Deutschland; November 2011

Reisekostenstipendium von GlaxoSmithKline für das Toll2011 Meeting – Decoding Innate Immunity; Riva del Garda, Italien; Mai 2011