

# **Der Einfluss von Toso bei der Effektorfunktion von Granulozyten**

Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.  
der Fakultät für Biologie  
an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

**Andreas Meryk**  
aus Leverkusen

Essen, September 2012

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Immunologie der Universität Duisburg Essen sowie an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführt.

1.Gutachter: Prof. Dr. Karl Sebastian Lang

2.Gutachter: Prof. Dr. Ulf Dittmer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Shirley Knauer

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2012

*meiner Familie gewidmet*



# ***INHALTSVERZEICHNIS***

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	V-VI
TABELLENVERZEICHNIS .....	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VIII-X
1. ZUSAMMENFASSUNG .....	1
1. SUMMARY .....	2
2. EINLEITUNG .....	3
2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	3
2.1.1. Infektionszyklus .....	4
2.1.2. Immunabwehr .....	5
2.2. Granulozyten .....	6
2.2.1. Granulozytopoese .....	6
2.2.2. Eliminierung der Listerien durch Granulozyten .....	8
2.2.2.1. Erkennung von Pathogenen .....	8
2.2.2.2. Synthese von Sauerstoffradikalen .....	10
2.2.2.3. Regulation der Degranulation .....	11
2.2.2.4. Bildung von NETs .....	12
2.3. Toso .....	13
2.3.1. Struktur des Proteins .....	13
2.3.2. Funktion von Toso .....	14
2.3.3. Expressionsprofil .....	15
2.4. Zielsetzung .....	15
3. MATERIAL UND METHODEN .....	17
3.1. Material .....	17
3.1.1. Chemikalien und Medien .....	17
3.1.2. Verbrauchsmaterial .....	17

---

3.1.3.	Geräte .....	18
3.1.4.	Kits .....	18
3.1.5.	Software.....	19
3.1.6.	Lösungen und Puffer .....	19
3.1.7.	Primer.....	20
3.1.8.	Antikörper .....	20
3.1.9.	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	21
3.1.10.	Zellen .....	21
3.1.11.	Versuchstiere.....	21
3.1.12.	Statistik .....	22
3.2.	Methoden.....	22
3.2.1.	Experimentelle Arbeiten <i>in vivo</i> .....	22
3.2.1.1.	Infektionen mit <i>Listeria monocytogenes</i> .....	22
3.2.1.2.	Depletion von Granulozyten .....	22
3.2.1.3.	Voraktivierung der Granulozyten <i>in vivo</i> .....	23
3.2.1.4.	Applikation von BrdU.....	23
3.2.1.5.	Adoptivtransfer von Granulozyten.....	23
3.2.1.6.	Blutentnahme.....	23
3.2.1.7.	Organentnahme.....	24
3.2.1.8.	Knochenmarkschimären.....	24
3.2.2.	Arbeiten mit Listerien.....	24
3.2.2.1.	Kultivierung von Listerien .....	24
3.2.2.2.	CFSE-Listerien.....	25
3.2.2.3.	Bestimmung bakterieller Titer in den Organen .....	25
3.2.3.	<i>Ex vivo</i> Arbeiten mit Granulozyten.....	25
3.2.3.1.	Granulozyten Priming und Aktivierung .....	25
3.2.3.2.	Detektion von ROS <i>in vivo</i> .....	26
3.2.3.3.	Einfluss von IgM auf ROS .....	26

3.2.3.4.	Phagozytose von Listerien .....	27
3.2.3.5.	IgM abhängige Phagozytose .....	27
3.2.3.6.	Oberflächenexpression von Toso .....	27
3.2.3.7.	Integrin Expression im naiven Blut .....	28
3.2.3.8.	Hitzeschock .....	28
3.2.3.9.	Apoptose von Granulozyten .....	28
3.2.4.	Zellkultur primärer Makrophagen .....	29
3.2.5.	Untersuchung von RNA .....	29
3.2.6.	ELISA .....	30
3.2.7.	Durchflusszytometrie .....	30
3.2.8.	Immunhistochemie .....	30
3.2.9.	Zellkultur .....	31
3.2.9.1.	Ernten von Zellen .....	31
3.2.9.2.	Generierung von GM-CSF und M-CSF .....	31
3.2.9.3.	Generierung von Makrophagen aus Knochenmark (MΦ) .....	32
3.2.9.4.	Aufreinigung von Granulozyten mittels MACS®Sort .....	32
4.	ERGEBNISSE .....	33
4.1.	Charakterisierung der <i>Toso</i> <sup>-/-</sup> Maus .....	34
4.2.	Erhöhte Suszeptibilität bei Defizienz von Toso während der Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> .....	35
4.3.	Toso Expression in Granulozyten .....	37
4.4.	Toso unabhängige Regulation der Blutgranulozytenpopulation .....	38
4.5.	Beeinträchtigte Phagozytose der Granulozyten bei Toso Defizienz .....	40
4.6.	Herunterregulierung von Toso durch Phagozytose .....	46
4.7.	Fehlregulierte ROS-Synthese und Degranulation von Toso defizienten Granulozyten .....	48
4.8.	Toso beeinflusst den Aktivierungszustand der Granulozyten .....	55
4.9.	Intrinsischer Defekt Toso defizienter Granulozyten .....	60

4.10.	Adoptivtransfer von C57BL/6 Granulozyten verbessert die Listerienkontrolle während der Infektion.....	61
5.	DISKUSSION .....	65
5.1.	Funktion von Toso auf die initiale Kontrolle der Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> .....	65
5.2.	Einflüsse von Toso auf die Quantität der Granulozyten.....	67
5.3.	Komplement und IgM abhängige Phagozytose.....	68
5.4.	Involvierung von Toso bei der ROS-Synthese .....	70
5.5.	Folgen der fehlgesteuerten ROS-Synthese.....	73
5.6.	Einfluss des Integrins CD11b .....	74
5.7.	Ausblick.....	75
6.	ANHANG.....	76
6.1.	<i>In vivo</i> Depletion von Makrophagen.....	76
6.2.	IgM abhängige Phagozytose im serumfreien Medium.....	77
6.3.	Konzentration von C3 im Serum.....	77
6.4.	ROS-Synthese in Einzelknochenmarkchimären .....	78
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	79
8.	DANKSAGUNG .....	88
9.	LEBENS LAUF .....	89
10.	PUBLIKATIONS LISTE .....	90
11.	ERKLÄRUNGEN.....	91



## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb. 2.1</b>	Intrazellulärer Lebenszyklus von <i>Listeria monocytogenes</i> .....	4
<b>Abb. 2.2</b>	Hämatopoese im Knochenmark.....	7
<b>Abb. 2.3</b>	Induktion des <i>Respiratory burst</i> der Granulozyten.....	10
<b>Abb. 2.4</b>	Modell des murinen Faim3/Toso-Moleküls.....	13
<b>Abb. 4.1</b>	Deletionsnachweis von Toso in der <i>Toso</i> <sup>-/-</sup> Maus.....	34
<b>Abb. 4.2</b>	Zusammensetzung des Blutes von naiven <i>Toso</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....	35
<b>Abb. 4.3</b>	Überlebenskurve der <i>Toso</i> <sup>-/-</sup> Mäuse bei einer sublethalen Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> .....	36
<b>Abb. 4.4</b>	Bakterientiter in den Organen.....	36
<b>Abb. 4.5</b>	Überlebenskurve bei der Depletion von Granulozyten während der Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> .....	37
<b>Abb. 4.6</b>	Oberflächenexpression von Toso.....	38
<b>Abb. 4.7</b>	Apoptose und Neubildung von Granulozyten.....	39
<b>Abb. 4.8</b>	Phagozytosepotenzial von Listerien durch Granulozyten.....	40
<b>Abb. 4.9</b>	IgM-abhängige Phagozytose von CFSE-Listerien.....	41
<b>Abb. 4.10</b>	Granulombildung in der Leber an Tag drei nach Listerieninfektion.....	43
<b>Abb. 4.11</b>	Konfokale Aufnahme Listerienphagozytischer Granulozyten.....	44
<b>Abb. 4.12</b>	Phagozytosekapazität von Makrophagen während <i>in vitro</i> Inkubation mit Listerien.....	45
<b>Abb. 4.13</b>	Phagozytose und Eliminierung von Listerien durch Makrophagen.....	46
<b>Abb. 4.14</b>	Expression von Toso bei der Phagozytose von Listerien.....	47
<b>Abb. 4.15</b>	IgM abhängige Internalisierung von Toso bei der Phagozytose von Listerien	47
<b>Abb. 4.16</b>	Korrelation zwischen Phagozytose und ROS-Produktion.....	48
<b>Abb. 4.17</b>	ROS-Synthese während der Primingphase.....	49
<b>Abb. 4.18</b>	ROS-Synthese bei Inkubation mit dem Aktivator fMLP.....	50
<b>Abb. 4.19</b>	<i>In vitro</i> induzierte ROS-Synthese nach der Priming- und Aktivierungsphase	51
<b>Abb. 4.20</b>	Temperatursensitivität der Granulozyten.....	52
<b>Abb. 4.21</b>	<i>In vivo</i> ROS-Synthese und Degranulation während einer Listerieninfektion...	53

<b>Abb. 4.22</b>	ROS-Synthese in Granulozyten der Milz .....	54
<b>Abb. 4.23</b>	Der Einfluss von IgM auf die ROS-Synthese der Granulozyten.....	55
<b>Abb. 4.24</b>	Expression von Integrinen auf naiven Blutgranulozyten .....	56
<b>Abb. 4.25</b>	Expression von CD11b nach dem Priming mit GM-CSF und LPS.....	56
<b>Abb. 4.26</b>	Einfluss der CD11b-Expression auf die Effektorfunktion von Granulozyten ...	57
<b>Abb. 4.27</b>	Überlebenskurve bei Defizienz von CD11b während einer Listerieninfektion	58
<b>Abb. 4.28</b>	Phagozytosekapazität voraktivierter Blutgranulozyten .....	59
<b>Abb. 4.29</b>	Überlebenskurve einer Listerieninfektion bei Voraktivierung .....	60
<b>Abb. 4.30</b>	Untersuchung der Granulozyten in gemischten Knochenmarkschimären.....	61
<b>Abb. 4.31</b>	Aufreinigung von Granulozyten aus dem Knochenmark.....	62
<b>Abb. 4.32</b>	Listerientiter nach adoptivem Transfer von Granulozyten .....	63
<b>Abb. 4.33</b>	Überlebenskurve der <i>Toso</i> <sup>-/-</sup> Mäuse nach adoptiven Granulozytentransfer während der Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> .....	64
<b>Abb. 5.1</b>	<i>In silico</i> Analyse des Toso Genlokus auf Chromosom 1 .....	69
<b>Abb. 5.2</b>	Phosphorylierung von p47phox über verschiedene MAP Kinase Wege .....	71
<b>Abb. 6.1</b>	Überlebenskurve von C57BL/6 Mäusen in Abhängigkeit von gewebeständigen Makrophagen bei einer Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> .....	76
<b>Abb. 6.2</b>	Phagozytose von CFSE Listerien in Abhängigkeit vom kommerziellen IgM.....	77
<b>Abb. 6.3</b>	Konzentration von C3 im Serum .....	77
<b>Abb. 6.4</b>	Untersuchung der Granulozyten in Einzelknochenmarkschimären .....	78

---

# ***TABELLENVERZEICHNIS***

<b>Tab. 2.1</b>	Übersicht der wichtigsten PRRs und entsprechenden Liganden bei einer Listerieninfektion .....	9
-----------------	---	---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7AAD	7-Aminoactinomycin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BMM $\Phi$	Knochenmarkgenerierte Makrophagen (bone marrow macrophage)
bp	Basenpaare
CD	cluster of differentiation
CFSE	Carboxy-fluorescein-diacetate-N-succinimidyl-ester
CFU	<i>colony forming unit</i>
CLP	<i>common lymphocyte cell progenitor</i>
CMP	<i>common myeloid cell progenitor</i>
DAPI	Diamidino-2-Phenylindole
DC	dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DHE	Dihydroethidium
DHR	Dihydrorhodamin 123
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetylsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosobent assay</i>
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alii</i> )
FACS	<i>fluorescence activated cell sort</i>
FAIM	Fas apoptotic inhibitory molecule
FcR	Fc-Rezeptoren
FCS	fetales Kälberserum ( <i>fetale calf serum</i> )
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
fMLP	N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine

---

GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierende Faktor ( <i>granulocytes macrophages colony stimulating factor</i> )
GMP	<i>granulocyte-macrophage progenitor</i>
HSC	Hämatopoetische Stammzelle ( <i>hematopoietic stem cell</i> )
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravenös
Ig	Immunoglobulin
IgV	variable Kette der Immunoglobine
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscoves Modified Dulbeccos Medium</i>
kDA	Kilo-Dalton
LCMV	lymphozytären Choriomeningitis Virus
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>magnetic activated cell sort</i>
M-CSF	Makrophagen koloniestimulierender Faktor ( <i>macrophages colony stimulating factor</i> )
MEP	<i>megakaryocyte-erythrocyte progenitor</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
ND	nicht detektierbar
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>
NOD	<i>Nucleotide Oligomerization Domain</i>
OD	optische Dichte
<i>p</i>	<i>Probability</i> (Wahrscheinlichkeit)
<i>p.i.</i>	nach Infektion ( <i>post infection</i> )
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PeCy7	Phycoerythrin-Cyanin-7

---

PerCP	Peridin-Chlorophyll
pH	<i>potentia hydrogenie</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PSG	Penicilin-Streptomycin-LGlutamine
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>round per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SPF	spezifiziert pathogenfrei
Tab	Tabelle
TLR	Toll ähnlicher Rezeptor ( <i>toll-like receptor</i> )
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
VSV	vesikuläre stomatitis Virus

# 1. ZUSAMMENFASSUNG

Die initiale Kontrolle einer bakteriellen Infektion ist von Zellen des angeborenen Immunsystems abhängig. Opsoniert durch das Komplementsystem und von Antikörpern unterschiedlicher Isotypen werden Pathogene von Granulozyten phagozytiert und durch die intrazelluläre Synthese von *reactive oxygen species* (ROS) eliminiert. Störungen wie die chronischen granulomatösen Erkrankungen (CGD), die die Funktion von Granulozyten beeinträchtigen, sind häufig mit chronischen und rezidivierenden Pilz und Bakterien Infektionen assoziiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von *fas apoptotic inhibitory molecule 3* (Faim3/Toso) mittels einer Deletionsmutante während einer Infektion mit dem Bakterium *Listeria monocytogenes* im Mausmodell betrachtet. Derzeit wird die funktionelle Wirkungsweise dieses Transmembranproteins als anti-apoptotisches Molekül bzw. als Rezeptor für IgM kontrovers diskutiert.

Toso defiziente Mäuse wiesen in der frühen Infektionsphase eine hohe Mortalität auf. Die spezifische Depletion der Granulozyten erhöhte die Suszeptibilität von C57BL/6 Mäusen für *L. monocytogenes*, wohingegen der adoptive Transfer von C57BL/6 Granulozyten die Resistenz von *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen wiederherstellte. Erstmals konnte die Expression von Toso auf Granulozyten und eine durch Phagozytose bedingte Herunterregulation des Proteins beschrieben werden. Der Einfluss von Toso auf den Phagozytoseprozess von Bakterien und die Synthese von ROS konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Die Deletion von Toso auf Blutgranulozyten verringerte die IgM abhängige Phagozytoserate von Bakterien. Desweiteren erhöhte Toso den Schwellenwert für die Induktion der ROS-Synthese und verhinderte eine frühzeitige Aktivierung und Degranulation der Granulozyten im Blut. Als Folge dieser Dysregulation wiesen Toso defiziente Mäuse verminderte Effektorfunktionen der Granulozyten im Gewebe und eine erhöhte Pathogenlast in den Organen auf.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde Toso als wichtiger Regulator für die Aktivierung und die Koordination der Effektorfunktionen von Granulozyten identifiziert.

## 1. SUMMARY

The initial control of bacterial infection depends on cells of the innate immune system. Pathogens which are opsonized by the complement system and antibodies of different isotypes are phagocytosed by granulocytes and eliminated by intracellular synthesis of reactive oxygen species (ROS). Disorders such as chronic granulomatous disease (CGD), which affect the function of granulocytes, are often associated with chronic and recurrent fungal and bacterial infections.

In the present work, the importance of fas apoptotic inhibitory molecule 3 (Faim3/Toso) was investigated by a knockout mice during infection with the bacterium *Listeria monocytogenes*. Currently, there is a controversial discussion about the functional mechanism of this transmembrane protein as anti-apoptotic molecule or a receptor for IgM.

Toso deficient mice succumbed in the early phase of infection. The specific depletion of granulocytes increased susceptibility of C57BL/6 mice for *L. monocytogenes*, while adoptive transfer of C57BL/6 granulocytes restored resistance of *Toso*<sup>-/-</sup> mice. For the first time expression of Toso on granulocytes and a phagocytosis depending downregulation of this protein were described. An influence of Toso for uptake of bacteria and synthesis of ROS were demonstrated *in vitro* and *in vivo*. The deletion of Toso on granulocytes reduced the IgM-dependent phagocytosis of bacteria. Furthermore, Toso increased the threshold for induction of ROS synthesis and prevented early activation and degranulation of the granulocytes in the blood. As a consequence of this dysregulation Toso deficient mice showed reduced effector functions of granulocytes in tissue and increased bacterial burden in the organs.

In the current thesis Toso has been identified as an important regulator for the activation and coordination of the effector functions in granulocytes.



## 2. ***EINLEITUNG***

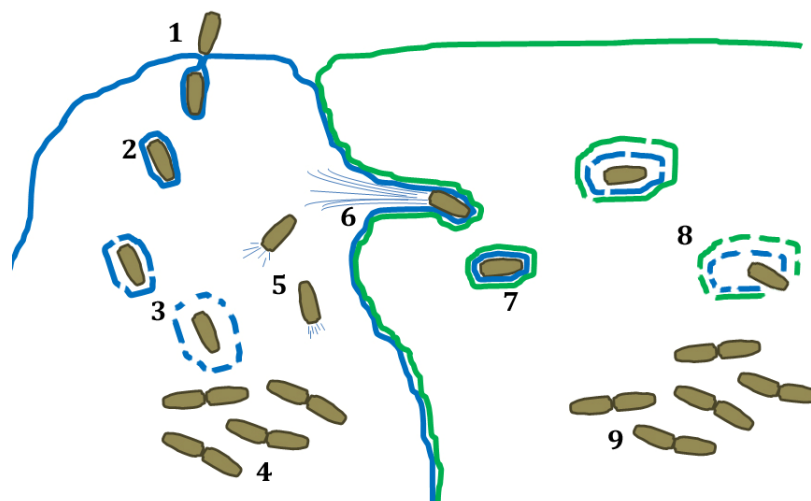
Mehrzellige Organismen sind einer Vielzahl von Pathogen ausgesetzt und haben Strategien entwickelt sich durch schnelle Erkennung und effiziente Abwehrmechanismen zu schützen. Im Verlauf der Evolution hat sich zunächst das phylogenetisch ältere angeborene Immunsystem entwickelt, das in allen vielzelligen Organismen vorkommt und Eindringlinge unmittelbar und pathogenunspezifisch bekämpft. Das adaptive Immunsystem hat sich erst in den letzten 500 Millionen Jahren entwickelt und ist bei allen Wirbeltieren zu finden. Es ist erregerspezifisch und benötigt nach Pathogenkontakt einige Tage bis zur Funktionalität. Zum angeborenen Immunsystem zählen mechanische Barrieren wie die Haut, humoralen Faktoren wie das Komplementsystem und Plasmaproteinen sowie zelluläre Faktoren wie Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen (DC) und natürliche Killer (NK)-Zellen. Das adaptive Immunsystem setzt sich aus B- und T-Zellen zusammen, welche durch klonale Expansion von spezifisch gegen einen Erreger ausgerichtete Effektorzellen Pathogene bekämpfen, die sich durch Immunevasionsmechanismen dem angeborenen Immunsystem zu entziehen drohen. Die beiden Arme des Immunsystems sind dabei eng miteinander verknüpft. Die Aktivierung des adaptiven Immunsystems setzt zwingend die Präsentation von Antigenen durch die Zellen des angeborenen Immunsystems voraus (Medzhitov and Janeway, 2000).

### 2.1. ***Listeria monocytogenes***

Die Gattung *Listeria* besteht aus sieben Arten, von denen nur *Listeria monocytogenes* sowohl tier- als auch humanpathogen ist (Vazquez-Boland et al., 2001a). *Listeria monocytogenes* ist ein gram-positives, stäbchenförmiges und fakultativ intrazellulär replizierendes Bakterium, welches eine Krankheit namens Listeriose verursacht (Sixl et al., 1978). Diese verläuft bei immunkompetenten Menschen meist symptomlos, kann aber in seltenen Fällen zu einer Gastroenteritis führen (Cossart, 2007). Bei immunsupprimierten und älteren Menschen kann eine akute Infektion mit Listerien eine Meningoenzephalitis oder Sepsis hervorrufen, wohingegen Schwangere einen Abort erleiden können (Antal et al., 2005; Gellin and Broome, 1989). Die Listeriose ist für weniger als 1% der über Lebensmittel erworbenen Erkrankungen verantwortlich und weist eine Mortalitätsrate von über 20% auf (Vazquez-Boland et al., 2001b).

### 2.1.1. Infektionszyklus

Der typische Infektionsweg von *Listeria monocytogenes* ist die orale Aufnahme über kontaminierte Nahrungsmittel. Nach der Aufnahme der Bakterien wird das Epithelgewebe des Gastrointestinaltraktes infiziert, welches die Interaktion von Internalin A der Bakterienzelle mit E-Cadherin der Enterozyten benötigt (Gaillard et al., 1991). Die Internalisation der Bakterien in die Wirtszelle erfolgt über einen Clathrin vermittelten Zipper-Mechanismus (Hamon et al., 2006). Mäuse sind gegen diese Infektionsroute, aufgrund einer einzelnen Punktmutation zwischen humanen und murinen E-Cadherin, relativ resistent (Lecuit et al., 2001). Diese Problematik wird umgangen, indem im Mausmodell meist eine intravenöse oder intraperitoneale Infektion durchgeführt wird. Bei oraler Inokulation durchbrechen die Bakterien die Epithelschicht des Darmes und gelangen über den Blutstrom zu den anderen Organen. In der Leber werden die Hepatozyten durch die Expression eines weiteren Oberflächenproteins, Internalin B, welcher an den *Hepatocyte growth factor receptor* (HGFR) bindet, befallen (Shen et al., 2000). Nach dem Eintritt in die Wirtszelle entkommen die Listerien durch die Expression des Hämolytins Listeriolysin O (LLO) aus dem Phagosom ins Zytoplasma (Bielecki et al., 1990). Im Wirtszytoplasma exprimieren die Listerien das *actin-assembly-inducing protein* (ActA), welches zur Bildung von Actin-Polymeren führt und den Bakterien Beweglichkeit innerhalb des Zytoplasmas und zur Infektion der Nachbarzellen verleiht (Domann et al., 1992; Kocks et al., 1992). Der Infektionszyklus ist in Abbildung 2.1. dargestellt.



**Abbildung 2.1.: Intrazellulärer Lebenszyklus von *Listeria monocytogenes*.** (1) Eindringen der Bakterien in die Wirtszelle über Internalin A oder B (InIA, InIB); (2) Überleben im Phagosom; (3) Lyse des Phagosoms durch LLO; (4) Vermehrung im Zytoplasma; (5) Fortbewegung mittels Assemblierung von Aktin durch *actin-assembly-inducing protein* (ActA) zu einem Aktinschweif; (6) Eindringen in die Nachbarzelle; (7) Überleben im Doppelmembran-Phagosom; (8) Lyse des Phagosoms; (9) Erneute Vermehrung in der Nachbarzelle.

## 2.1.2. Immunabwehr

*Listeria monocytogenes* ist seit den 1960er Jahren ein etabliertes System, um die zellulären Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems im Mausmodell zu untersuchen (Mackaness, 1962). Innerhalb weniger Minuten nach einer intravenösen Injektion befallen die Bakterien die Milz und die Leber, in welchen sie von gewebständigen Makrophagen aufgenommen werden (Conlan, 1996). Durch proinflammatorische Zytokine angelockt, wandern die neutrophilen Granulozyten chemotaktisch als erste Leukozytenpopulation zum Infektionsort und verhindern die weitere Replikation der Bakterien (Czuprynski et al., 1994; Rogers and Unanue, 1993). Die sezernierten Zytokine der Granulozyten fördern die Migration von Makrophagen aus dem Blut zum Infektionsort (Guleria and Pollard, 2001; Mandel and Cheers, 1980). Das vom entzündeten Gewebe freigesetzte Chemokin CCL2 rekrutiert vor allem inflammatorische Monozyten, die sich am Infektionsort zu TNF $\alpha$  und iNOS produzierenden dendritischen Zellen (TIP-DCs) entwickeln (Serbina et al., 2003). Zusammen unterdrücken diese frühinflammatorischen Zellen die weitere Replikation der Listerien bis die Zellen des angeborenen Immunsystems entwickelt sind. Das Fehlen von einer dieser Zellpopulationen führt zu stark gesteigerter Suszeptibilität und Mortalität (Czuprynski et al., 1994; Havell, 1987; Samsom et al., 1997; Serbina et al., 2003). Die endgültige Eliminierung der Listerien ist entscheidend abhängig von einer Listerien spezifischen T-Zell Immunantwort. Die Verknüpfung zum adaptiven Immunsystem wird über die Präsentation von Antigenen auf dendritischen Zellen und Makrophagen geschaffen. Diese sind Teil des angeborenen Immunsystems und essentiell für die Generierung einer potenten T-Zell-Immunantwort (Jung et al., 2002). Die Entwicklung benötigt eine gewisse Zeit, weswegen die ersten Listerien spezifischen T-Zellen vier bis fünf Tage nach der Infektion auftreten und den Höhepunkt in der klonalen Expansion zwischen dem siebten und neunten Tag der Infektion erreichen (Busch et al., 1998). Nach der Eliminierung des Pathogens kontrahieren die Listerien spezifischen T-Zellen zu der kleineren Zellpopulation der stabilen Memory T-Zellen. Diese sind verglichen mit naiven T-Zellen größer in der Anzahl, weisen einen niedrigeren Schwellenwert für die Aktivierung mit einem spezifischen Antigen auf und erreichen sehr schnell bei einer wiederholten Infektion ihre Effektorfunktionen. Auf diese Weise schützen Memory-T-Zellen vor einer Reinfektion mit Listerien (Bancroft et al., 1991; Bhardwaj et al., 1998). Die humorale Immunantwort über B-Lymphozyten spielt während einer Infektion mit Listerien eine untergeordnete Rolle, da sich die meisten Listerien im Zellinneren aufhalten und die

Verbreitung intrazellulär über die Nachbarzelle ohne Eintritt ins extrazelluläre Milieu abläuft (Mackaness, 1962). Dennoch tragen in naiven Tieren natürlich vorkommende anti-Listerien Antikörper zu Beginn der Infektion dazu bei die Ausbreitung der Listerien in die Organe zu reduzieren (Ochsenbein et al., 1999).

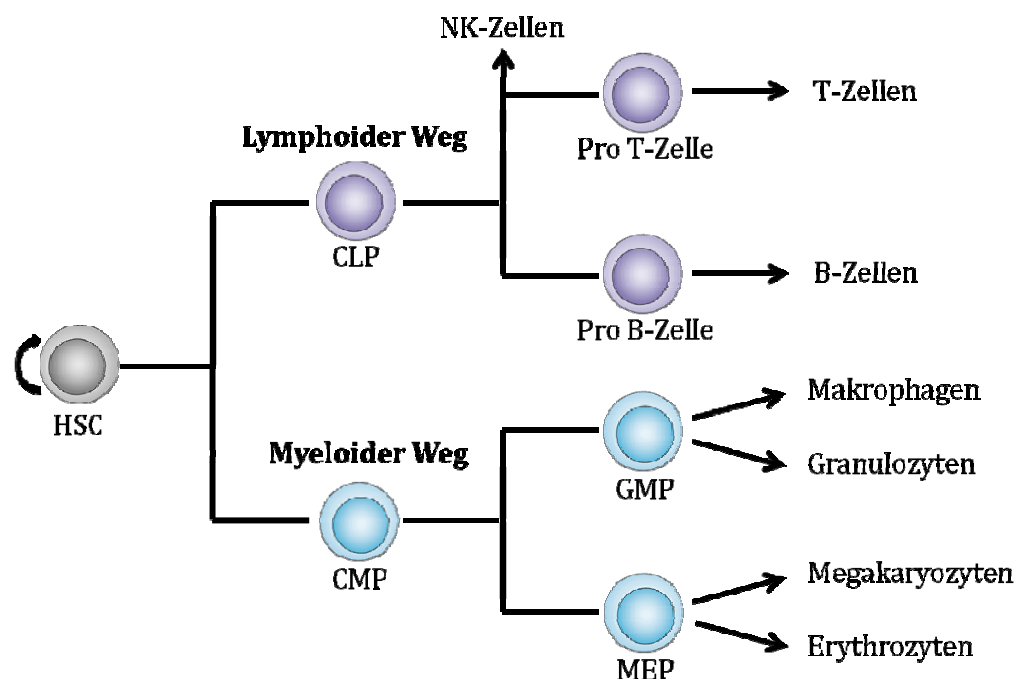
## **2.2. Granulozyten**

Granulozyten (vom lat. granulum „Körnchen“) sind polymorphkernige, zum angeborenen Immunsystem zählende, Leukozyten und charakterisiert durch die Anwesenheit von Granula im Zytoplasma. Anhand ihres Färbeverhaltens können sie in drei Gruppen unterteilt werden: neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten. Die neutrophilen Granulozyten sind für die Abwehr von Bakterien und Pilzen zuständig, während eosinophile und basophile Granulozyten vorrangig für die Bekämpfung von mehrzelligen Parasiten (z.B. Würmern) verantwortlich sind. Den größten Anteil mit 50-60% aller Leukozyten im Blut stellen die neutrophilen Granulozyten von denen jeden Tag  $10^{11}$  neu gebildete Zellen das Knochenmark verlassen (Furze and Rankin, 2008). Die Lebensdauer eines neutrophilen Granulozyten nach dem Austritt aus dem Knochenmark ins Blut beträgt bis zu acht Stunden. Werden sie jedoch durch einen Stimulus oder Pathogen aktiviert, verlängert sich die Lebensdauer auf bis zu zwei Tage (Kobayashi et al., 2005). In der folgenden Arbeit wird der Begriff Granulozyten ausschließlich für die neutrophilen Granulozyten verwendet.

### **2.2.1. Granulozytopoese**

Die Blutbildung (Hämatopoese) geht von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC) im Knochenmark aus, die aus einer Abfolge von hierarchischer Zellteilung alle reifen Blutzellen hervorbringen (Cantor and Orkin, 2001). Die HSC sind durch die Expression von CD34<sup>+</sup> gekennzeichnet und durch asymmetrische Zellteilung entstehen aus einer Stammzelle zwei verschiedene Tochterzellen (Giebel et al., 2006). Die eine Tochterzelle verbleibt in einem pluripotenten, undifferenzierten Zustand, wodurch der Stammzellpool im Knochenmark aufrecht erhalten bleibt, und die zweite Tochterzelle differenziert zu einer Progenitorzelle mit eingeschränktem Differenzierungspotenzial aus der sich entweder die gemeinsame lymphoide Progenitorzelle (CLP) oder die gemeinsame myeloide Progenitorzelle (CMP) entwickelt (Akashi et al., 2000a; Akashi et al., 2000b). Aus

der CLP entwickeln sich über Vorläufer die lymphoide Reihe mit B-, T- und natürliche Killer (NK)-Zellen, während aus der heterogenen Gruppe der CMP die Vorläufer der myeloiden Reihe mit Makrophagen und Granulozyten (GMP) oder die Megakaryozyten und Erythrozyten (MEP) hervorgehen (Dexter, 1990). Diese Entwicklung ist determiniert, so dass aus der CLP keine myeloiden und aus der CMP keine lymphoiden Zellen entwickelt werden können (Akashi et al., 2000b; Kondo et al., 1997). Aus dem GMPs differenzieren sich hauptsächlich neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Monozyten und nur in kleinen Mengen basophile und eosinophile Granulozyten und Mastzellen (Abbildung 2.2.) (Cantor and Orkin, 2001).



**Abbildung 2.2.: Hämatopoese im Knochenmark.** Die selbstregenerierenden pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC) bringen die Vorläuferzellen mit eingeschränktem Differenzierungspotential für die lymphoide (*common lymphoid progenitor*; CLP) und myeloide (*common myeloid progenitor*; CMP) Reihe hervor. Aus der CLP entwickeln sich über weitere Vorläufer die NK-, B- und T-Zellen, während aus der CMP die GMPs (*Granulocyte/macrophage progenitors*) und die MEPs (*Megakaryocyte/erythrocyte progenitor*) entstehen. Dies sind die Vorläufer für die Makrophagen und Granulozyten (GMP) oder für die Erythrozyten und Megakaryozyten (MEP). Die Abbildung wurde nach (Akashi et al., 2000b) erstellt.

Die kurze Lebenszeitspanne von wenigen Stunden macht eine ständige Neubildung der Granulozyten (Granulozytopoese) unumgänglich. Obwohl die Granulozyten im Blut nur einen Bruchteil der Erythrozyten ausmachen, übersteigt im Knochenmark die Granulozytopoese die Erythropoese. Aus der GMP entwickeln sich durch Proliferation und Differenzierung reife segmentkernigen Granulozyten. Die ersten Stadien der Granulozytopoese, ausgehend vom GMP über den Myeloblasten zum Promyelozyten und

anschließend zum Myelozyten sind nur durch Proliferation gekennzeichnet. Hierbei entstehen aus einem Promyelozyten mindestens acht Myelozyten. Aus dem Myelozyten entstehen durch Differenzierung zunächst stabkernige und abschließend die reifen segmentkernigen Granulozyten (Borregaard et al., 1995).

## **2.2.2. Eliminierung der Listerien durch Granulozyten**

### **2.2.2.1. Erkennung von Pathogenen**

Pathogene werden durch den Wirt über nicht im Wirtsorganismus vorkommende Proteine, DNA oder RNA (Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs)) identifiziert. Die PAMPs sind evolutionär hoch konservierte Strukturen, die für das Überleben des Pathogens essentiell sind (z.B. LPS), weswegen diese keinen Immunevasionsmechanismus bilden können (Medzhitov, 2001). Die Erkennung der PAMPs erfolgt über die sehr heterogene Gruppe der Pattern-Recognition Receptors (PRRs), die in lösliche, transmembrane und zytosolische PRRs eingeteilt werden. Die löslichen PRRs sind vorwiegend Kolektin, Ficolin und Pentraxin, die an die Oberfläche von Bakterien binden und das Komplementsystems aktivieren (Iwasaki and Medzhitov, 2010). Durch die Bindung der Komplementfaktoren opsoniert, werden die Pathogene von Granulozyten über Komplementrezeptoren wie den Komplementrezeptor 3 (CD11b/CD18) phagozytiert, wodurch zusätzlich deren Expression durch die Mobilisierung von in Granula gespeicherten Rezeptoren verstärkt wird (Berger et al., 1984; Sengelov, 1995). Die transmembranen PRRs sind Toll-like Rezeptoren und entweder auf der Plasmamembran der Zelle oder in endosomalen/lysosomalen Organellen exprimiert (Takeda and Akira, 2005). TLRs auf der Oberfläche von Granulozyten erkennen konservierte Zellmembranstrukturen wie Lipopolysaccharide (LPS) von gram-negativen Bakterien (TLR 4), Lipoteichonsäure von gram-positiven Bakterien (TLR 2) oder Flagellin (TLR5), wohingegen endosomale TLRs hauptsächlich Nukleinsäuren erkennen (TLR 3, 7, 9) (Iwasaki and Medzhitov, 2010). TLRs werden von fast allen Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystem exprimiert und die Erkennung von PAMPs durch TLRs führt zur Aktivierung von Signaltransduktionswegen und in Abhängigkeit vom TLR zu unterschiedlichen Genexpressionsmustern von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Proteinen (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Takeda and Akira, 2005; Takeuchi et al., 1999). Bei den zytosolischen PRRs sind für die Granulozyten die NOD-like

Rezeptoren (*Nucleotide Oligomerization Domain*) von großer Bedeutung. Diese erkennen 2,6 Diaminopimelinsäure (meso-DAP), ein Peptidoglycan konstitutiv exprimiert von gram-negativen Bakterien, oder MDP (Muramyl Dipeptide), ein Peptidoglycan von gram-positiven und gram-negativen Bakterien, und führen zur Aktivierung von inflammatorischen Signalkaskaden (Strober et al., 2006).

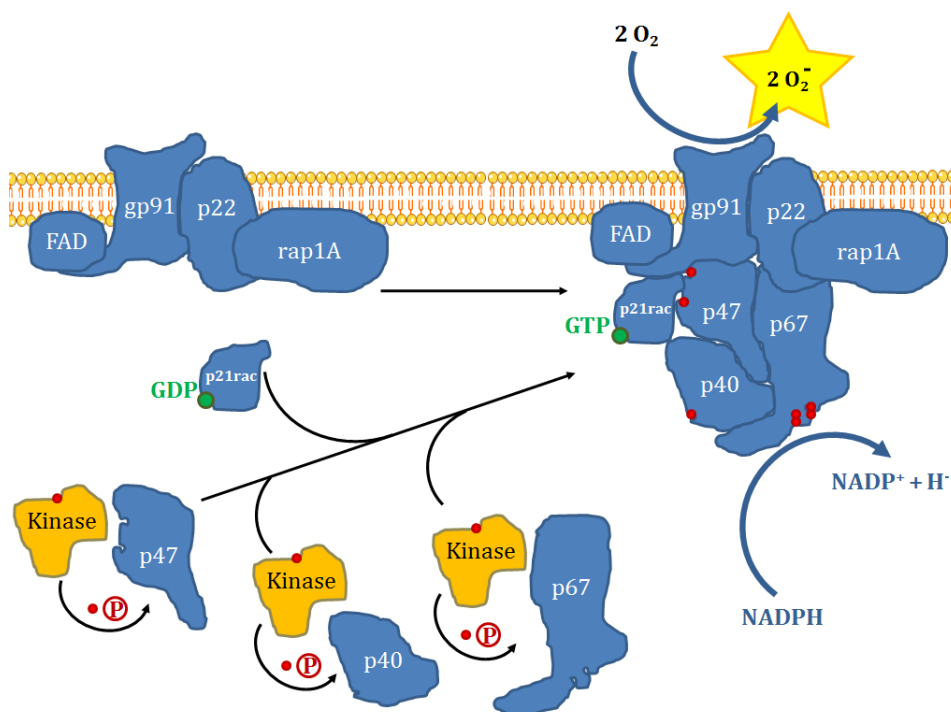
**Tabelle 2.1.** Übersicht der wichtigsten PRRs und entsprechenden Liganden bei einer Listerieninfektion.

PRR	Ligand	Vorkommen des PRR
Collektin, Ficolin, Pentraxin (Komplementsystem)	Kohlenhydratreste und diverse PAMPs	Löslich
TLR2	Peptidoglykane Lipoteichonsäure	Zelloberfläche
TLR5	Flagellin	Zelloberfläche
FPR	fMLP	Zelloberfläche
TLR9	Unmethylierte CpG DNA	Intrazellulär
NOD2	Muramyl Dipeptide	Intrazellulär

Die Granulozyten exprimieren außerdem zur Pathogenerkennung Formyl Peptide Rezeptoren (fpr) die zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren zählen (Migeotte et al., 2006). Im Menschen gehören zu der fpr Familie FPR1, FPRL1 und FPRL2, während in der Maus FPR1 und FPR2 beschrieben sind (Le et al., 2002; Migeotte et al., 2006). An FPR bindet N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine (fMLP), welcher ein Bestandteil bakterieller Zellwände ist. Es wirkt chemotaktisch auf die Granulozyten und löst die Zytokinproduktion und die Freisetzung von Granula aus (Hartt et al., 1999). Die Bedeutung dieser Rezeptorenklasse für Granulozyten wurde in der *fpr*<sup>-/-</sup> Maus verdeutlicht, die eine stark erhöhte Suszeptibilität bei einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* aufweist (Gao et al., 1999). Die wichtigsten PRRs der Granulozyten einschließlich deren Ligaden sowie deren Expression sind in der Tabelle 2.1. zusammengefasst.

### 2.2.2.2. Synthese von Sauerstoffradikalen

Nach der Erkennung und der Phagozytose von Pathogenen produzieren Granulozyten große Mengen an Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species* ; ROS), ein Vorgang der auch als *Respiratory Burst* bezeichnet wird, und für das Eliminieren der Pathogene im Phagolysosom essentiell ist (Segal et al., 1981). Die Radikale werden zunächst durch die NADPH-Oxidase, welche in der Plasmamembran und im Phagosom lokalisiert und aus sechs Untereinheiten aufgebaut ist, durch Oxidation von NADPH auf der zytosolischen Membranseite und Reduktion von  $O_2$  auf der Außenseite der Membran gebildet (Abbildung 2.3.). Bei diesem Vorgang entstehen zunächst Superoxide ( $O_2^-$ ), die aufgrund ihrer Instabilität durch die Superoxid-Dismutase in das stabile Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) umgewandelt werden. (Segal, 2005). Das Wasserstoffperoxid dient als Substrat für die Myeloperoxidase (MPO), die die Bildung von hypochloriger Säure (HOCL) unter Verwendung von Chloridionen katalysiert und etwa 5 % des gesamten Neutrophilenproteins und etwa 25 % des Granulaproteins ausmacht (Hampton et al., 1998). Dieses hochreaktive Produkt reagiert mit der DNA, Proteinen und Lipiden der Mikroorganismen und induziert das Absterben der Bakterien.



**Abbildung 2.3.: Induktion des *Respiratory burst* der Granulozyten.** Die zytosolischen Komponenten der NADPH Oxidase ( $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$ ,  $p40^{phox}$ ,  $p21rac$ ) assemblieren nach Phosphorylierung im Zytoplasma mit den membranständigen Komponenten ( $gp91$ ,  $p22$ ) zum vollständigen Komplex. Die weitere  $p47^{phox}$  Phosphorylierung im Komplex führt zur Aktivierung der NADPH Oxidase, welche unter Verwendung von NADPH durch Reduktion von  $O_2$   $O_2^-$  katalysiert.



Die ROS-Synthese erfolgt in einem streng regulierten zweistufigen Prozess aus Priming und Aktivierung der Granulozyten. Im nicht aktivierten Granulozyten sind einige Untereinheiten der NADPH Oxidase im Zytoplasma verteilt und werden erst durch das Priming phosphoryliert, wodurch diese aus dem Zytoplasma zur Membran wandern und zum vollständigen Komplex assoziieren (Clark et al., 1990; Dang et al., 1999; DeLeo et al., 1998; Wientjes et al., 1993) (Abbildung 2.3.). Durch das Priming wird in den Granulozyten kaum ROS synthetisiert, jedoch die Sensitivität auf einen zweiten Stimulus wie bakterielle N-formyl Peptide potenziert und anschließend große Mengen an ROS synthetisiert (Elbim et al., 1994; Morel et al., 1991). Die Bedeutung der NADPH Oxidase für die Eliminierung von Mikroben wurde beim Menschen bei der durch die Dysfunktion der NADPH Oxidase verursachten Krankheitsgruppe chronische granulomatöse Erkrankung (CGD) beschrieben, bei der die Patienten suszeptibel gegen Bakterien und Pilz Infektionen sind (Thrasher et al., 1994; Winkelstein et al., 2000).

### **2.2.2.3. Regulation der Degranulation**

Die Granulozyten speichern in Granula Proteine mit vorwiegend antimikrobieller Funktion, die in die Gruppen primäre, sekundäre, tertiäre und sekretorische Granula unterteilt werden (Borregaard and Cowland, 1997; Chertov et al., 2000). In diesen Granula sind über 300 Proteine enthalten, die in die Umgebung abgegeben werden können oder mit der Plasmamembran verschmelzen (Lominadze et al., 2005). Während der Migration vom Blut zum Infektionsort werden die Granula in einer festgelegten Reihenfolge ausgeschüttet. Die sekretorischen Granula werden unverzüglich bei Kontakt der Granulozyten mit dem Endothelium entleert, die tertiären bei der Migration durch das Endothelium und die sekundären und primären am Infektionsort (Borregaard and Cowland, 1997; Faurschou and Borregaard, 2003). Die sekretorischen Granula enthalten eine Ansammlung von Membranrezeptoren wie  $\beta_2$ -Integrine, Komplementrezeptoren, Formyl Peptide Rezeptoren (fpr), CD14 und CD16, welche durch den Einbau in die Plasmamembran die Morphologie der Granulozyten verändern und die zuvor relativ inaktiven Granulozyten sensitiv auf inflammatorische Signale machen (Sengelov et al., 1993a; Sengelov et al., 1993b). Desweiteren enthalten die sekretorischen Granula Untereinheiten der NADPH Oxidase (Borregaard and Tauber, 1984). Die tertiären Granula beinhalten vor allem Matrix degradierende Proteine, die die Extravasation und Diapedese der Granulozyten ermöglichen (Joiner et al., 1989; Mollinedo et al., 1997). In den sekundären Granula sind antimikrobielle Substanzen und Proteine (z.B. Lactoferrin,

NGAL, Lysozyme) enthalten, die ins Phagosom oder nach außen abgegeben werden (Maallem et al., 1982; Ogawa et al., 1983). Die primären Granula sind gefüllt mit Proteasen und antimikrobiellen Proteinen wie Myeloperoxidase, Defensine, Cathepsin G und Elastase (Rice et al., 1987; Salvesen et al., 1987; Sinha et al., 1987). Das Ausschütten der Granula ist ein streng kontrollierter Vorgang, der als "regulierte Exozytose" bezeichnet wird. (Nusse and Lindau, 1988; Toonen and Verhage, 2003). Die Exozytose der Granulasubtypen ist dabei durch ansteigende Schwellenwerte für aktivierende Stimuli kontrolliert. Die sekretorische Granula weisen einen niedrigeren Schwellenwert als tertiäre und tertiäre einen niedrigeren als sekundäre und primäre Granula auf (Kjeldsen et al., 1993; Kjeldsen et al., 1992; Sengelov et al., 1993a) Die Granulasubtypen werden während der verschiedenen Differenzierungsstadien der Granulozyten im Knochenmark gebildet und mit den Proteinen gefüllt (Borregaard et al., 1995). Nach dem Austritt der Granulozyten ins Blut werden die neusynthetisierten Proteine nicht mehr in Granula gepackt (Theilgaard-Monch et al., 2004).

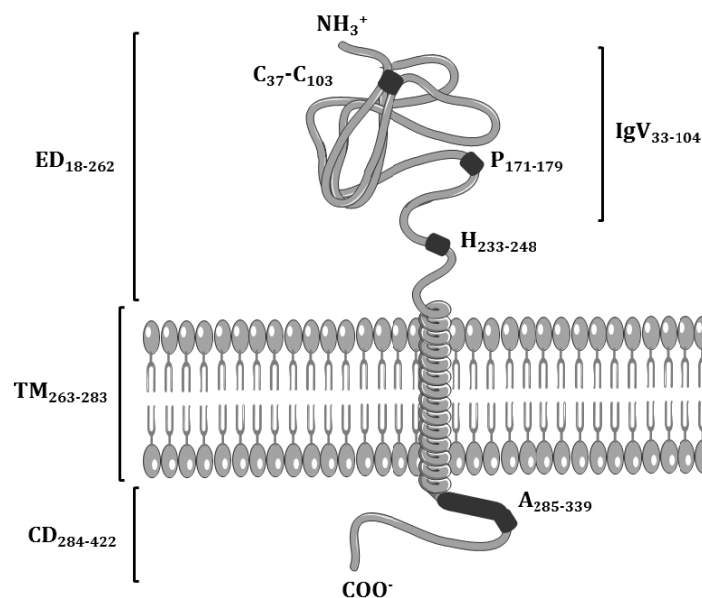
#### **2.2.2.4. Bildung von NETs**

Die Bildung von *neutrophil extracellular traps* (NET) ist ein alternativer Sterbevorgang (Netose) zwischen Apoptose und Nekrose, wodurch die Granulozyten auch nach dem Sterben noch antimikrobille Funktion besitzen. Während der Netose schwillt der Zellkern an und das Chromatin wird aufgelöst, wodurch lange Stränge von unkondensierter DNA an der Proteine aus dem Zytoplasma und den Granula sowie Histone angeheftet sind aus der Zelle ausgestoßen werden (Brinkmann et al., 2004; Brinkmann and Zychlinsky, 2007). Die NET-Proteine sind wegen der Bindung an die DNA hauptsächlich kationisch geladen und sind überwiegend Defensine, Elastasen, Proteinase 3, Lactoferrin und Myeloperoxidase (Urban et al., 2009). Die Bildung von NETs ist abhängig von der Synthese von Hydrogenperoxid durch die NADPH Oxidase und dessen weitere Metabolisierung durch die Myeloperoxidase (Bianchi et al., 2009; Papayannopoulos et al., 2010). Die fibrilläre Matrix der NETs bindet die Bakterien, wodurch deren Verbreitung verhindert wird. Die NETs werden nach einiger Zeit durch im Blut vorkommende DNAsen abgebaut. Menschen mit einer Störung der DNase-1 Aktivität weisen ein höheres Risiko für Nierenentzündungen und Zellschäden auf (Fuchs et al., 2007; Hakkim et al., 2010).

## 2.3. Toso

### 2.3.1. Struktur des Proteins

Das Typ I Transmembranprotein Faim 3/Toso (in der folgenden Arbeit nur noch als Toso bezeichnet) wurde 1998 von Hitoshi *et al.* als Regulator im Fas-Signalweg beschrieben (Hitoshi *et al.*, 1998). Das kodierende Gen liegt sowohl bei der Maus als auch beim Menschen auf Chromosom eins und enthält acht Exons. In der Maus besteht das Protein aus 422 AS, von denen 17 AS das N-terminale Signalpeptid, 244 AS die extrazelluläre, 20 AS die transmembrane und 138 AS die zytoplasmatische Domäne bilden (Abbildung 2.4.). Die extrazelluläre Domäne von Toso weist eine Homologie zur variablen Immunoglobulinregion (IgV) auf und die zytoplasmatische Region hat eine Homologie zur FAST Kinase (*Fas-activated serine/threonine kinase*) (Hitoshi *et al.*, 1998). Beim humanen Toso stimmt die Nukleotidsequenz zu 78% und die AS-Sequenz zu 58% mit dem murinen Toso überein. Die Grundstruktur weist jedoch die gleichen funktionellen Domänen auf (Shima *et al.*, 2010). Kürzlich wurde im Menschen eine alternative Splicing Variante von Toso beschrieben, welche als lösliches Molekül im Blut entdeckt wurde (Li *et al.*, 2011).



**Abbildung 2.4.: Modell des murinen Faim3/Toso-Moleküls.** (47 kDa). Das Protein besteht aus einer extrazellulären Domäne (ED) von 28 kDa, einer transmembranen Domäne (TM) von 2,5 kDa und einer zytoplasmatischen Domäne (CD) von 16 kDa. Der Einbau in die Plasmamembran erfolgt ohne das N-terminale Signalpeptid von 17 Aminosäuren. Extrazellulär befindet sich eine konservierte IgV-Domäne, die über die Aminosäuren 33-104 reicht und durch Schwefelbrücken über Cysteine C<sub>37</sub> und C<sub>103</sub> Verbindungen entstehen. Proximal der IgV-Domäne befindet sich eine prolinreiche (P) und eine histidinreiche (H) Sequenz. Die zytoplasmatische Domäne von Toso weist eine basische argininreiche Region (A) proximal der Transmembran auf. (übernommen von Funkner, 2012).

### 2.3.2. Funktion von Toso

Die Erstpublikation zu Toso beschrieb eine inhibitorische Aktivität gegen FAS, TNF $\alpha$  und FADD induzierte Apoptose, jedoch nicht gegen Staurosporine und Ceramide induzierte Apoptose (Hitoshi et al., 1998). Dieser signalwegspezifische Effekt lässt eine inhibitorische Wirkung von Toso auf die Caspase 8 vermuten. Die Interaktion der intrazellulären Domäne von Toso mit FADD und die negative Regulation der Caspase 8 konnte in einer Folgestudie nachgewiesen werden (Song and Jacob, 2005). In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde die intrazelluläre Wirkungsweise von Toso aufgeklärt. Den Autoren zufolge bindet RIP1 konstitutiv an Toso und bildet einen trimolekularen Komplex mit FADD, der bei Stimulation über den FAS Rezeptor stabilisiert wird (Nguyen et al., 2011). Als Folge steht FADD nicht mehr für effizientes Apoptosesignal über den aktivierten FAS Rezeptor zur Verfügung und apoptotische Vorgänge werden verringert. Toso erhöht somit den Schwellenwert für die FAS induzierte Apoptose (Nguyen et al., 2011). Dieses Modell der Funktion von Toso korreliert mit den Beobachtungen durch *Richter et al.* bei denen ein Knockdown von Toso in primären humanen T-Zellen zu einer erhöhten FAS Ligand induzierten Apoptose führte (Richter et al., 2009).

In der letzten Zeit wird die anti-apoptotische Wirkung von Toso kontrovers diskutiert und eine Funktion von Toso als Rezeptor für IgM postuliert, weswegen Toso nun auch als Fc $\mu$ R bezeichnet wird (Kubagawa et al., 2009; Shima et al., 2010). Die IgM bindende Eigenschaft von Toso führte zu Zweifel an der in der Erstpublikation beschriebenen anti-apoptotischen Wirkung, da dort ein anti-FAS Antikörper vom IgM Isotypen verwendet wurde. *Kubagawa et al.* konnten in ihren Versuchen zeigen, dass Toso *per se* keine anti-apoptotische Wirkung besitzt, sondern nur bei Ligation des FAS Rezeptors mit einem anti-FAS Antikörper vom IgM, aber nicht vom IgG Isotypen (Kubagawa et al., 2009). Innerhalb weniger Minuten führt die Bindung von IgM an Toso in humanen B-Zellen zur Internalisation von Toso und IgM und nach Transport ins Lysosom zur Degradation (Vire et al., 2011). Die IgM bindende Eigenschaft von Toso konnte jedoch nicht von *Nguyen et al.* beobachtet werden und wird zur Zeit kontrovers diskutiert (Honjo et al., 2012; Nguyen et al., 2012). Jedoch stützt sich die beschriebene anti-apoptotische Wirkung von Toso nicht nur auf den FAS-Ligand, sondern auch auf die mit den Zytokinen TNF $\alpha$  und TRAIL induzierte Apoptose (Nguyen et al., 2011).

### 2.3.3. Expressionsprofil

Das Molekül Toso wurde zunächst auf aktivierten T-Zellen identifiziert, wohingegen naive T-Zellen kaum Toso auf der Oberfläche exprimieren (Hitoshi et al., 1998; Nguyen et al., 2011). Die Analyse der Genexpression mittels Microarray hingegen zeigte, dass die mRNA von Toso in naiven und Memory T-Zellen stark exprimiert ist und bei Aktivierung der T-Zellen herunterreguliert wird (Abbas et al., 2005). Die transiente Expression des Proteins auf aktivierten T-Zellen wird hierbei im Zusammenhang mit der anti-apoptotischen Wirkung gebracht (Nguyen et al., 2011). In den folgenden Jahren konnte zusätzlich die Expression von Toso auf naiven B-Zellen, eine Hochregulation auf aktivierten B-Zellen und eine Expression auf NKT-Zellen nachgewiesen werden (Kubagawa et al., 2009; Nguyen et al., 2011; Pallasch et al., 2008). Eine Akkumulation von großen Mengen des Proteins konnte in den Vesikeln des *trans* Golghi Netzwerkes aufgefunden werden (Vire et al., 2011). Im Menschen gewann Toso an Bedeutung für die Forschung, nachdem bei CLL-Patienten (chronische lymphatische Leukämie), einem B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom, eine Überexpression von Toso auf B-Zellen beobachtet wurde (Pallasch et al., 2008; Pallasch and Wendtner, 2009). Das Level der Überexpression korrelierte hierbei mit der Intensität und Aggressivität der Erkrankung. Bei T-Zellen konnte ebenfalls eine Überexpression von Toso mit Autoimmunerkrankungen in Assoziation gebracht werden. In voll aktivierten T-Zellen wird die Toso mRNA nach einiger Zeit herunterreguliert, wohingegen die Microarray Analyse bei autoreaktiven T-Zellen von Patienten mit systemischen Lupus erythematoses (SLE) eine konstitutive Toso Expression zeigte (Deng et al., 2006).

### 2.4. Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Relevanz von Toso im Mausmodell während einer Infektion mit dem gram-positiven Bakterium *Listeria monocytogenes* untersucht. Granulozyten sind die ersten Zellen des Körpers, die zur Eindämmung einer bakteriellen Infektion ins entzündete Gewebe migrieren. Die Verbreitung der Bakterien durch die Granulozyten wird im Wesentlichen durch Phagozytose und der anschließenden Synthese von Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*; ROS) verhindert. Wie diese beiden Abwehrmechanismen synchronisiert sind, ist weitestgehend unklar. Das Ziel der

Dissertation ist die funktionelle Einordnung des Membranproteins Toso auf die Regulation dieser Prozesse.

In Vorarbeiten konnte erstmals gezeigt werden, dass Toso auf Granulozyten exprimiert ist. Zur Beantwortung der obigen Fragestellung wird eine Toso defiziente (*Toso*<sup>-/-</sup>) Maus verwendet. Der Einfluss von Toso auf die Phagozytose und die Synthese von ROS sollte hierbei sowohl durch *in vitro* Untersuchungen von naiven Granulozyten als auch durch Analysen der Granulozyten *in vivo* während der Infektion mit Listerien betrachtet werden. Zur abschließenden Beurteilung der Bedeutung von Toso sollten adaptive Granulozyten Transfers durchgeführt werden.

## 3. MATERIAL UND METHODEN

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Chemikalien und Medien

Die laborüblichen Standardchemikalien wurden von AppliChem (Darmstadt), Merk (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (München) bezogen. Medien für die Zellkultur wurden bei Pan Biotech (Aldenbach), Biochrom (Berlin) oder Invitrogen (Darmstadt) bestellt.

Brain Heart Infusion	BD Bioscience, Heidelberg
Brain Heart Infusion Agar	Fluka, München
Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)	Invitrogen, Darmstadt
Cyclophosphamid (CY)	Sigma, München
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Invitrogen, Darmstadt
dihydro-ethidium (DHE)	Invitrogen, Darmstadt
dihydro-rhodamin 123 (DHR)	Alexis, Lörrach
N-Formylmethionyl-Lencyl-Phenylalanin (fMLP)	Sigma, München
FACS Lysing Solution	BD Bioscience, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Isofluran	Delta Select GmbH, Pfullingen
Lipopolysaccharides von <i>Escherichia coli</i> (LPS)	Sigma, München
peqGOLD TriFast™	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Temozolomid	Sigma, München
TNF $\alpha$	R&D Systems

#### 3.1.2. Verbrauchsmaterial

Für die Zellkultur wurden Verbrauchsmaterialien von TPP (FaustLaborbedarf, Schaffhausen) sowie Cellstar (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) verwendet. Weitere

Lieferanten von Verbrauchsmaterial waren BD Bioscience (Heidelberg), VWR International (Darmstadt), ebioscience (Frankfurt), Qiagen (Hilden) und Eppendorf (Hamburg).

### 3.1.3. Geräte

Cell-Observer	Zeiss, Jena
ELISA Reader	AnthosLabtecInstruments GmbH, Wals-Siezenheim
FACSCalibur	BD Bioscience, Heidelberg
FACSCanto™II	BD Bioscience, Heidelberg
Fluoreszenz-Mikroskop HS BZ-9000	Keyence GmbH, Neu-Isenburg
Gefrierschrank -80°C	Thermo Scientific, Schwerte
Kryostat CM 3050S	Leica, Wetzlar
NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Neubauer-Zählkammer <i>improved</i>	Karl Hecht GmbH&Co KG, Sondheim
pH Messgerät	WTW GmbH, Weilheim
Thermoblock	Oehmen GmbH, Essen
TissueLyserII	QIAGEN, Hilden
Untertisch-Zentrifuge	Heraeus Instruments GmbH&Co. KG, Düsseldorf
Micro 220R-Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen

### 3.1.4. Kits

Annexin V Apoptosis Detection Kit II	BD Pharmigen™, Heidelberg
BrdU Flow Kit	BD Pharmigen™, Heidelberg
(anti) Ly6G MicroBead Kit	Miltenyi BioTech, Bergisch-Gladbach
Mouse GM-CSF ELISA Set BD OptEIA™	BD Bioscience, Heidelberg
MPO ELISA Kit	Hycult Biotech, Beutelsbach
Quantikine Mouse M-CSF ELISA Kit	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN GmbH, Hilden



SYBR®Green

AppliedBiosystems, Darmstadt

### 3.1.5. Software

7500 Software v2.0.1

AppliedBiosystems, Darmstadt

AxioVision Rel.4.7

Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena

FacsDiva v&amp;6.2.1

BD Bioscience

FlowJo 7.6.1

TreeStar Inc., Ashland (OR, USA)

GraphPad Prism5

GraphPad Software, La Jolla  
(CA, USA)

MicrosoftOffice 2007

Microsoft Corporation, Redmont  
(WA, USA)

Photoshop CS3

Adobe Systems, München

### 3.1.6. Lösungen und Puffer

Medien wurde teilweise Antibiotika aus einer Kombinationslösung bestehend aus Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin (PSG; Sigma-Aldrich, München) zugesetzt. Das zum Ansetzen von Lösungen verwendete Wasser wurde doppelt destilliert von der Universitätsapotheke der HHU bezogen oder über eine Millipore-Anlage (Millipore, Darmstadt) eigens doppelt destilliert und folgend als ddH<sub>2</sub>O bezeichnet.

#### Zellkulturmedien

BMMΦ

VLE-DMEM  
10% (v/v) FCS  
50 mM β-Mercaptoethanol

GM-CSF

VLE-DMEM  
5% (v/v) FCS  
50 mM β-Mercaptoethanol

M-CSF

VLE-DMEM  
10% (v/v) FCS

## Lösungen

FACS-Puffer	PBS- 2% (v/v) FCS 0,1% (v/v) NaN <sub>3</sub> 2 mM EDTA
MACS-Puffer	0,5% (v/v) FCS 2 mM EDTA PBS-
EDTA-Lösung	0,5 M EDTA pH 8,0
Erythrozyten-Lyse-Puffer	0,5 M NH <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> 10mM KHCO <sub>3</sub> 0,1mM EDTA pH 7,42
Einfriermedium	20% (v/v) DMSO 80% (v/v) FCS
Sodiumazid (100x)	10% (v/v) NaN <sub>3</sub>

### 3.1.7. Primer

In dieser Arbeit wurden folgende QuantiTect Primer Assay (QIAGEN, Hilden) verwendet.

Mm_Rn18s_2	18S RNA
Mm_Faim3_1	FAIM3/Toso

### 3.1.8. Antikörper

In dieser Arbeit wurden direkt fluoreszenzgekoppelte Antikörper von BD Pharmigen (Heidelberg) sowie eBioscience (Frankfurt) bezogen und nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die Detektion von Toso erfolgte mit Toso-spezifischen IgG anti-Maus Antikörper, welcher im Labor von Frau Kyeong-Hee Lee hergestellt wurde (Nguyen et al., 2011). Die genutzten Fluorochrome waren FITC, PE, PerCP, APC, und PeCy7.

### 3.1.9. *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* (Stamm 43251; ATTC, Wesel) Bakterien wurden von Prof. Klaus Pfeffer (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt und wurden mit *brain heart infusion* Medium (BHI-Medium) kultiviert.

### 3.1.10. Zellen

In der hier vorgestellten Arbeit fanden die murine Fibroblasten-Zelllinie L-929 zur Generierung von M-CSF und die Myelom-Zelllinie X63 zur Herstellung von GM-CSF Verwendung.

### 3.1.11. Versuchstiere

Die verwendeten Versuchstiere (*Mus musculus*) wurden in der zentralen Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und der Universitätsklinik Essen gehalten. Die Mäuse wurden in Kunststoffkäfigen entsprechend den deutschen Gesetzen für den Tierschutz gehalten. Die Versuchstiere wurden mit Standardfutter und Wasser *ad libitum* ernährt und in einem regelmäßigen zwölf Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Die Tierhaltung erfolgte zum Teil unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF). Alle in dieser Arbeit verwendeten Deletionsmutanten wurden mindestens für zehn Generationen auf C57BL/6J-Hintergrund zurückgekreuzt. Experimentelle Versuche wurden ausschließlich mit Gewicht- und Alters-angepassten zwischen acht und zwanzig Wochen alten Mäusen durchgeführt.

<i>CD11b</i> <sup>-/-</sup>	C57BL/6J.129S4- <i>Itgam</i> <sup>tm1Myd</sup> /J
<i>JH</i> <sup>-/-</sup>	C57BL/6J.129Sv-JH <sup>tm</sup>
<i>Toso</i> <sup>-/-</sup>	C57BL/6J-toso <sup>tm</sup>
<i>Toso</i> <sup>-/-</sup> <i>xCD11b</i> <sup>-/-</sup>	C57BL/6.129S4-toso <sup>tm</sup> <i>Itgam</i> <sup>tm1Myd</sup>
<i>sIgM</i> <sup>-/-</sup>	C57BL/6.129Sv-sIgM <sup>tm</sup>

### 3.1.12. Statistik

Die Daten wurden als Mittelwerte und die Standardabweichung als SEM angegeben. Zur statistischen Analyse wurde zum Vergleich zweier Gruppen der ungepaarte *Student's t test* verwendet. Statistische Signifikanzen der Messergebnisse über mehrere Zeitpunkte wurden über 2-Wege ANOVA berechnet. Für die statistische Analyse bei Überlebenszeitexperimenten wurde der Mantel-Cox (Log-Rank) Test verwendet.

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Experimentelle Arbeiten *in vivo*

#### 3.2.1.1. Infektionen mit *Listeria monocytogenes*

Die Verabreichung von *Listeria monocytogenes* (Listerien) wurde intravenös in die Schwanzvene der Tiere unter einer Sterilbank durchgeführt. In der Regel wurde eine sublethale Konzentration von  $10^4$  CFU Listerien in einer Infektionsröhre mit einer 24G Edelstahlkanüle (Terumo Neolus®, Neuwied) appliziert. Die Listerien wurden entsprechend in PBS verdünnt und in einem Volumen von 200  $\mu$ l verabreicht.

#### 3.2.1.2. Depletion von Granulozyten

Die Granulozyten wurden einen Tag vor der Infektion mit Listerien durch die intravenöse Verabreichung von 200  $\mu$ g des anti-Gr1 Antikörpers NimpR14 (BD Bioscience, Heidelberg) depletiert. Die chemische Eliminierung der Leukozyten erfolgte intraperitoneal mit Cyclophosphamid (200 mg/kg Körpergewicht) und Temozolomid (90 mg/kg Körpergewicht) drei Tage vor der Infektion mit Listerien.

### **3.2.1.3. Voraktivierung der Granulozyten *in vivo***

C57BL/6 Mäuse wurden mit  $10^4$  CFU Listerien infiziert. Jeweils eine Gruppe blieb unbehandelt und bekam PBS. Einer weiteren Gruppe wurden 120 ng GM-CSF bzw. 120 ng GM-CSF und 100 ng fMLP an Tagen 1, 2 und 3 *p.i.* verabreicht.

### **3.2.1.4. Applikation von BrdU**

BrdU wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in PBS angesetzt und über einen Zeitraum von zwei Tagen alle 12 Stunden jeder Maus intraperitoneal 200  $\mu$ l (2 mg) appliziert. Die Detektion von BrdU in Granulozyten aus dem Blut erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### **3.2.1.5. Adoptivtransfer von Granulozyten**

Für den adoptiven Transfer von Granulozyten wurden  $8 \times 10^6$  aufgereinigte Zellen intravenös in PBS verabreicht. Hierfür wurde das Knochenmark aus Femur und Tibia der Hinterbeine von C57BL/6 oder Toso<sup>-/-</sup> Mäusen steril isoliert. Die Granulozyten wurden anschließend durch die Magnet assoziierte Aufreinigung (MACS) mit dem Ly6G-Kit von Miltenyi Biotec angereichert und nur Zellfraktionen mit einer Reinheit von >95% weiter verwendet.

### **3.2.1.6. Blutentnahme**

Den Versuchstieren wurde venöses Blut aus dem retrobulbären Venenplexus unter Narkose mit Isofluran (Delta Select, Pfullingen) entnommen. Bis zu 200  $\mu$ l Vollblut wurden je nach Verwendungszweck in unbeschichte Röhrchen für Serum oder in heparinbeschichte Röhrchen für Plasma gegeben. Das heparinisierte Blut wurde vorwiegend direkt für die Durchflusszytometrie verwendet, während das Serum für die Bestimmung von Antikörpern verwendet wurde. Die Abtrennung des Serums und vom geronnenen Blut erfolgte durch 30 minütige Inkubation des entnommenen Blutes auf Eis

und anschließender 10 minütiger Zentrifugation bei 6000 rpm. Das Serum sowie das Plasma wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **3.2.1.7. Organentnahme**

Die Entnahme von Organen erfolgte nach zervikaler Dislokation der Versuchstiere. Das Fell der Tiere wurde desinfiziert und das Peritoneum geöffnet. Die Organe wurden für die Titerbestimmung der Listerien, Immunhistologie, Untersuchung von Immunzellen sowie für die RNA-Isolation entnommen. Zur Bestimmung bakterieller Titer im Gewebe wurden die entnommenen Organe in 2 ml Eppendorfgefäßen (Eppendorf GmbH, Hamburg) mit 1 ml PBS und einer Metallkugel (QIAGEN, Hilden) überführt und 10 min bei 30 rps im TissueLyser (QIAGEN, Hilden) homogenisiert. Für immunhistologische Untersuchungen wurden Organstücke nach der Entnahme in Historöhrchen mit O.C.T. Kryoeinbettmedium (TissueTek; Weckert, Kitzingen) überschichtet und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Bei der Untersuchung von Zellen wurden die Organe im Medium auf Eis bis zum Gebrauch verwahrt. Für die RNA-Isolation wurden kleine Organstücke in 1,5 ml Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### **3.2.1.8. Knochenmarkchimären**

C57BL/6 Mäuse wurden mit 1050 rad in einer Kobalt-Anlage in der Radiologie der Universitätsklinik Düsseldorf bestrahlt. Am Folgetag wurden die Tiere mit einem 1:1 Gemisch ( $10^7$  Zellen) Knochenmarkszellen isoliert aus C57BL/6 x CD45.1 sowie *Toso*<sup>-/-</sup> x CD45.2 intravenös rekonstituiert. Die Adaptionszeit nach der Rekonstitution betrug mindestens 30 Tage.

## **3.2.2. Arbeiten mit Listerien**

### **3.2.2.1. Kultivierung von Listerien**

Zur Animpfung einer Listerien-Flüssigkultur wurden 10-20 µl Stockkultur ca. 12 h bei 37°C und 200 rpm in 3 ml autoklavierten BHI-Mediums im Schüttelinkubator kultiviert, so

dass eine OD<sub>600</sub> von 0,7 bis 1,3 erreicht wurde. Eine OD von 1,0 entspricht 10<sup>9</sup> Listerien pro ml.

### **3.2.2.2. CFSE-Listerien**

10<sup>9</sup> CFU Listerien wurden in 10 ml PBS mit 50 µM Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) 10 min bei 37°C inkubiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C wurden die CFSE-Listerien zunächst zweimal mit 10% FCS/PBS gewaschen und anschließend zweimal mit DMEM gewaschen.

### **3.2.2.3. Bestimmung bakterieller Titer in den Organen**

Die Milz, Leber und in einigen Fällen das Gehirn wurden entnommen und in einem Eppendorfgefäß mit 1 ml PBS und einer Metallkugel (QIAGEN, Hilden) im TissueLyser (QIAGEN, Hilden) für 10 min bei 30 rps homogenisiert. Anschließend wurden die Organe auf Eis verwahrt und am selben Tag die Titerbestimmung durchgeführt. Dazu wurden in 96-Well Platten 135 µl PBS vorgelegt und 65 µl des homogenisierten Organs horizontal titriert. Anschließend wurden 25 µl aus jedem zweiten Well (jeweils annähernd 1:10 Verdünnung der Anfangskonzentration) auf eine 24-Well Platte mit BHI-Agar überführt. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend die CFU der Listerien ausgezählt.

## **3.2.3. Ex vivo Arbeiten mit Granulozyten**

### **3.2.3.1. Granulozyten Priming und Aktivierung**

10 µl peripheren Blutes entsprechender Untersuchungstiere wurden mit *m*TNFα (R&D Systems, Wiesbaden), LPS (Sigma Aldrich, München) oder GM-CSF (Kapitel 3.2.9.2) für 30 min bei 37°C in einem Gesamtansatz von 100 µl Antikörperlösung inkubiert. Anschließend wurden die Granulozyten für 15 min mit 2 µl fMLP (Sigma Aldrich, München) aktiviert. Im Gesamtansatz befanden sich die fluoreszenzgekoppelten Antikörper anti-Gr1 und anti-CD11b und zur Detektion von ROS Dihydrorhodamin

(50 µg/ml; Alexis, Lörrach). Anschließend wurde das Blut mit FACS-Lysing-Solution (BD Bioscience, Heidelberg) lysiert. Für Primingstudien wurde der Ansatz bereits nach der Inkubation mit TNF $\alpha$ , LPS oder GM-CSF lysiert. Für die Detektion von ROS nach der Aktivierung mit fMLP wurde das Blut direkt für 30 min mit verschiedenen Konzentration des Reagenz bei 37°C inkubiert. Bei der Detektion von ROS in Verbindung mit CFSE gelabelten Listerien wurde ersatzweise Dihydroethidium (DHE; Invitrogen, Darmstadt) anstatt Dihydrorhodamin (DHR) verwendet.

### **3.2.3.2. Detektion von ROS *in vivo***

C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit 10<sup>4</sup> CFU Listerien infiziert und an den angegebenen Tagen Blut oder die Organe entnommen. Die ROS-Synthese wurde in der Durchflusszytometrie unter der Verwendung von Dihydrorhodamin (DHR) detektiert und entweder der prozentuale Anteil der ROS produzierenden Granulozyten bezogen auf die Gesamtpopulation der Granulozyten oder die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von DHR angegeben. Bei der Detektion von ROS im Blut wurde vor der Durchflusszytometrie eine Erythrozyten-Lyse mit der FACS-Lysing Solution durchgeführt.

### **3.2.3.3. Einfluss von IgM auf ROS**

Peripheres Blut wurde zur Entfernung von löslichem IgM über eine fünfminütige Zentrifugation bei 300 g und 4°C dreimal mit Medium gewaschen. Anschließend wurde das gewaschene Blut in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an aufgereinigtem murinen IgM $\kappa$  (BD Bioscience, Heidelberg) und 160 ng/ml GM-CSF für eine halbe Stunde und für weitere 15 min mit 2 µM fMLP bei 37°C inkubiert. Der Versuchsansatz bestehend aus DMEM-Medium versetzt mit anti-Gr1, anti-CD11b und DHR, dem Blut sowie dem fMLP umfasste ein Gesamtvolumen von 100 µl. Im Anschluss an die Inkubation wurde das Blut mit FACS-Lysing Solution (BD Bioscience, Heidelberg) lysiert und die ROS produzierenden Granulozyten in der Durchflusszytometrie detektiert.



### 3.2.3.4. Phagozytose von Listerien

Das periphere Blut (10 µl) wurde für eine Stunde mit 10<sup>6</sup> CFU CSFE-Listerien bei 37°C in einem Gesamtansatz von 100 µl DMEM-Medium versetzt und mit Fluoreszenz gekoppeltem anti-Gr1 Antikörper inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit FACS-Lysing Solution (BD Bioscience, Heidelberg) lysiert und die CFSE-Listerien positiven Granulozyten in der Durchflusszytometrie quantifiziert. Für die histologische Betrachtung der Phagozytose wurden 10<sup>6</sup> CFU CFSE-Listerien mit 30 µl Blut für zwei Stunden in Gegenwart von Penicilin und Streptomycin bei 37°C inkubiert. Im Inkubationsansatz befanden sich die Antikörper anti-Gr1 und anti-CD11b. Nach der Inkubation wurde das Blut fixiert, auf Objektträger zentrifugiert und anschließend konfokal mikroskopiert.

### 3.2.3.5. IgM abhängige Phagozytose

C57BL/6 und *sIgM*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit 10<sup>4</sup> CFU Listerien infiziert und drei Tage später das Blut zur Gewinnung von Serum entnommen. 10<sup>6</sup> CFU CFSE-Listerien wurden für eine Stunde mit 10 µl Serum pro Ansatz über einen Zeitraum von 60 min bei 4°C vorinkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für eine Stunde mit gewaschenem Blut von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit FACS-Lysing Solution (BD Bioscience, Heidelberg) lysiert und die CFSE-Listerien positiven Granulozyten in der Durchflusszytometrie quantifiziert

### 3.2.3.6. Oberflächenexpression von Toso

Das Knochenmark entsprechender Versuchstiere wurde isoliert und 10<sup>6</sup> Knochenmarkszellen bei 37°C für eine halbe Stunde mit 10<sup>8</sup> CFU Listerien inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal 10 min bei 1200 g und 4°C mit DMEM-Medium gewaschen und für weitere 30 min einem FC-Block mit murinem anti-CD16/CD32 (BD Bioscience, Heidelberg) unterzogen. Nach erneutem Waschschrift wurden die Zellen 30 min mit einem Toso-spezifischen IgG anti-Maus Antikörper, welcher im Labor von Frau Kyeong-Hee Lee hergestellt wurde, und mit anti-Gr1 oder anti-CD19 Antikörpern gefärbt. Anschließend wurde der Ansatz zweifach wie oben beschrieben gewaschen, die Zellen für zehn Minuten mit 2 µl 7AAD je Ansatz inkubiert und die Analyse in der

Durchflusszytometrie durchgeführt. Unter Ausschluss toter Zellen (7AAD<sup>+</sup>) wurde die Expression von Toso als mittlere Fluoreszenzintensität quantifiziert.

### **3.2.3.7. Integrin Expression im naiven Blut**

Für die Detektion der Expression von CD11a, CD11b und CD18 auf Granulozyten wurden 10 µl frisch entnommenen Blutes direkt mit 2% Formalin/PBS 10 min fixiert. Die fixierten Zellen wurden 30 min mit anti-Gr1 und anti-Cd11a (BD Biosciences, Heidelberg), anti-CD11b, oder anti-CD18 (eBiosciences, Heidelberg) Antikörpern bei 4°C inkubiert und anschließend das Blut lysiert. Die Expression der Oberflächenantigene wurde in der Durchflusszytometrie analysiert und als mittlere Fluoreszenzintensität quantifiziert.

### **3.2.3.8. Hitzeschock**

10 µl des peripheren Blutes von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen wurden in 100 µl DMEM versetzt mit 2% FCS sowie anti-Gr1 und anti-CD11b 30min bei 4°C, 15°C, 24°C, 37°C und 42°C inkubiert. Das Blut wurde anschließend mit der FACS-Lysing Solution (BD Bioscience, Heidelberg) lysiert und die Degranulation der Granulozyten in der Durchflusszytometrie über die Verringerung der Granularität im Seitwärtsstreulicht (SSC) bestimmt.

### **3.2.3.9. Apoptose von Granulozyten**

20 µl Heparin behandelten Vollblutes wurden mit 40 ng/ml GM-CSF über einen Zeitraum von sieben Stunden bei 37°C inkubiert oder blieben unbehandelt. Die Detektion apoptotischer Vorgänge wurde unter der Verwendung von AnnexinV Apoptosis Detection Kit II (BD Pharmingen, Heidelberg) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Apoptotische Zellen wurden in der Durchflusszytometrie als 7AAD<sup>+/-</sup> und AnnexinV<sup>+</sup> definiert.

### 3.2.4. Zellkultur primärer Makrophagen

C57BL/6 sowie *Toso*<sup>-/-</sup> Makrophagen wurden aus dem Knochenmark der Tiere unter der Verwendung von M-CSF generiert und am zehnten Tag nach Differenzierungsbeginn verwendet. Für immunhistologische Untersuchungen wurden  $10^5$  lebender Makrophagen (Trypanblau) zwölf Stunden vor dem Beginn des Experiments auf Cover-Slips ausgesät und bei 37°C adhären lassen. Anschließend wurde das Kulturmedium gewechselt und die Makrophagen für zwei Stunden mit CFSE gelabelten Listerien inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 2% Formalin/PBS fixiert und für die konfokale Mikroskopie mit anti-F4/80 fluoreszenzgekoppelten Antikörper gefärbt.

Zur Ermittlung der Pathogen-Eliminierungskapazität von Makrophagen wurden  $10^5$  lebender Zellen für zwölf Stunden unter Zusatz von 10 ng/ml TNF $\alpha$  sowie 200 Units IFN $\gamma$  in einer 24-Well Platte ausgesät. Anschließend wurden die Makrophagen zwei Stunden mit  $10^5$  CFU Listerien (MOI 1,0) bei 37°C inkubiert und im Anschluss die Wells zur Entfernung verbliebener nicht phagozytierter Bakterien viermal mit Medium gewaschen. Zur Bestimmung der noch infektiösen, nicht eliminierten Bakterientiter wurden die Makrophagen zwei Minuten mit einer 50% Saponin/PBS-Lösung inkubiert, was eine Permeabilisierung der Makrophagenzellmembran zufolge hatte. Anschließend konnten die bakteriellen Titer bestimmt werden.

### 3.2.5. Untersuchung von RNA

Die RNA aus Geweben wurde mit TriFast®/Trizol (PeqLab, Erlangen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Für die Isolation wurden in der Regel Organstücke mit einem Gewicht von 50-100 mg verwendet, welche mit einer Metallkugel (QIAGEN, Hilden) 5 min bei 30 rps im Trizol mittels TissueLyser (QIAGEN, Hilden) homogenisiert wurden. Zur Qualitätskontrolle der isolierten RNA wurden 500 ng Gesamt-RNA elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde 1  $\mu$ g Gesamt-RNA unter der Verwendung des QuantiTect Reverse Transcription Kits (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Die relative Genexpression wurde in der quantitativen *real time* PCR unter der Verwendung von SYBR®Green (AppliedBiosystems, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers quantifiziert. Hierfür wurden je Messansatz 50 ng cDNA verwendet. Die relative Transkriptmenge wurde nach 40 Zyklen auf die 18S rRNA abgeglichen und als

$2^{-\Delta Ct}$  angegeben. Ein Transkript, welches nach 40 Zyklen nicht amplifizierbar war, galt als nicht detektierbar (ND).

### **3.2.6. ELISA**

Zytokinkonzentrationen von GM-CSF und M-CSF aus den Zellüberständen (KAP) wurden mittels ELISA nach Angaben der entsprechenden Hersteller bestimmt. MPO wurde im Plasma nach Angaben des Herstellers quantifiziert.

### **3.2.7. Durchflusszytometrie**

Die durchflusszytometrische Untersuchung von Leukozyten heparinisierten Vollblutes sowie Zellen isoliert aus Organen erfolgte am FACSCanto II™ oder FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg). Es wurden maximal  $2 \times 10^6$  Zellen einer Einzelzellsuspension in einem FACS-Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg) mit 50  $\mu$ l Antikörperlösung, bestehend aus FACS-Puffer oder Medium und fluoreszenzgekoppelten Antikörpern 30 min bei 4°C oder 37°C im Dunkeln inkubiert. Zur Bestimmung von absoluten Zellzahlen wurden der Antikörperlösung bei Bedarf Kallibrierungsbeads (BC Calibrite™Beads; BD Bioscience, Heidelberg) zugesetzt. Die Antikörper wurden nach Herstellerangaben verwendet. Anschließend an die Inkubation wurde das Blut mit FACS-Lysing-Solution (BD Bioscience) nach Herstellerangaben lysiert, durch fünfminütige Zentrifugation bei 300 g und 4°C gewaschen und anschließend in der Durchflusszytometrie analysiert. Tote Zellen wurden mit DAPI gefärbt (Invitrogen, Darmstadt).

### **3.2.8. Immunhistochemie**

Am Kryostat wurden aus den entsprechend vorbereiteten Organen (KAP) 8 mm dicke Organschnitte auf Objektträgern angefertigt. Nach einer einstündigen Trocknungszeit bei RT wurden die Schnitte für 10 min in Aceton fixiert und nach kurzer Abdampfungszeit unspezifische Bindungsstellen durch zehnmünütige Inkubation in einer Blocklösung (10% FCS/PBS) abgesättigt. In einer Färbekammer wurden die Kryoschnitte mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gelöst und im Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l Blocklösung 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit

Blocklösung gewaschen und mit Eindeckmedium (Fluorescence Mounting Medium; Dako, Hamburg) luftblasenfrei eingedeckelt.

### **3.2.9. Zellkultur**

#### **3.2.9.1. Ernten von Zellen**

Zum Abernten adhärenter Zellen wurde das Kulturmedium verworfen und der Zellrasen zweifach mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 0,1 V des Kultivierungsmediums Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom, Berlin) in die Flasche gegeben und nach einer Inkubationszeit von 3 bis 5 min bei 37°C die Zellen mit entsprechendem FCS haltigem Medium abgestoppt. Das Abklopfen der Kulturflasche löste die Zellen ab, die dann bei 300 g und 4°C 10 min zentrifugiert und im frischen Medium resuspendiert werden konnten.

#### **3.2.9.2. Generierung von GM-CSF und M-CSF**

Zur Herstellung von GM-CSF wurde eine transgene Zelllinie (X63-GM CSF, Dr. Karasuyama, 1988; Basel) nach beschriebenen Protokollen verwendet (Karasuyama and Melchers, 1988; Stockinger and Hausmann, 1994; Stockinger et al., 1996; Zal et al., 1994). Die Kultivierung erfolgte im VLE-DMEM mit 50 µM β-Mercaptoethanol und 5% FCS. Nach einer zweitägigen Expansion der frisch aufgetauten Zellen wurden diese geerntet und  $8 \times 10^5$  Zellen pro 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche in 40 ml Medium über einen Zeitraum von sieben Tagen inkubiert. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung über ELISA (Kapitel 3.2.6).

M-CSF wurde aus dem Überstand von L929 Zellen, welche in VLE-DMEM versetzt mit 5% FCS und 50 µM β-Mercaptoethanol in einer 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche kultiviert wurden, gewonnen. Hierfür wurden  $8 \times 10^5$  Zellen auf 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche verteilt und bis zur Konfluenz inkubiert. Nach weiteren 24 bis 48 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Zytokinkonzentration über einen ELISA bestimmt (Kapitel 3.2.6).

Der Überstand beider Zelllinien wurde nach der Abnahme 20 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend mit einem 0,45 µm Filter (VWR, Darmstadt) steril filtriert.

### 3.2.9.3. Generierung von Makrophagen aus Knochenmark (MΦ)

Die Generierung von Makrophagen erfolgte unter dem Einfluss des Wachstumsfaktors M-CSF bei dem sich aus myeloiden Stammzellen im Knochenmark Makrophagen entwickeln (Weischenfeldt and Porse, 2008). Das Differenzierungsmedium wurde mit 0,4 ng/ml M-CSF versetzt. Die Isolation und Kultivierung wurde nach bereits beschriebenen Protokollen durchgeführt (Ehltling et al., 2011; Weischenfeldt and Porse, 2008). An Tag acht bis zehn nach Differenzierungsbeginn konnten die generierten Makrophagen experimentell verwendet werden.

### 3.2.9.4. Aufreinigung von Granulozyten mittels MACS®Sort

Die Aufreinigung von Granulozyten erfolgte als positive Selektion (MACS®Cell Separation anti-Ly6G MicroBeads Kit; Miltenyi, Bergisch-Gladbach) unter der Nutzung der *magnetic associated cell sort* (MACS®) Methode. Das Knochenmark aus Femur und Tibia wurde isoliert und durch ein 70 µm Zellsieb vereinzelt. Die Einzelzellsuspension wurde nach Angaben des Herstellers mit den Antikörpern inkubiert. Die Trennung erfolgte mittels LS-Magnetsäulen (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) und die Reinheit wurde in der Durchflusszytometrie überprüft. Nur Zellfraktionen mit einer Reinheit von >95% Granulozyten wurden weiter verwendet.

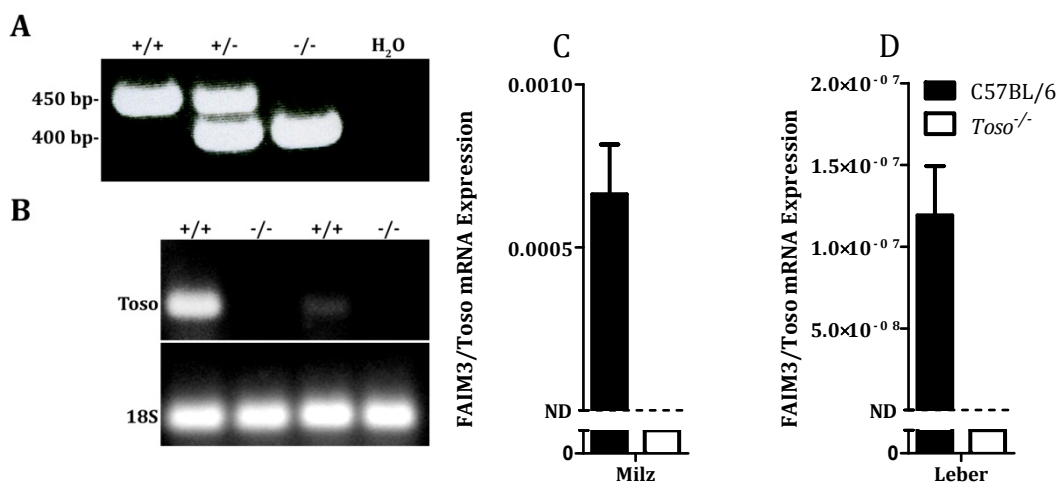
## 4. **ERGEBNISSE**

Granulozyten sind die Hauptzellpopulation des peripheren Leukozytenpools und als Bestandteil des angeborenen Immunsystems für die Bekämpfung bakterieller Pathogene essentiell (Metcalf, 1991; Senn and Jungi, 1975). Innerhalb von wenigen Stunden werden diese durch frühinflammatorische Zytokine chemotaktisch an den Ort der Infektion gelockt (Sabroe et al., 2005a; Sabroe et al., 2005b). Opsoniert durch das Komplementsystem und Antikörper werden die Bakterien von Granulozyten über *pattern-recognition receptors* (PRRs) erkannt und phagozytiert (Medzhitov, 2001). Die aufgenommenen Bakterien werden im Phagosom eingeschlossen und zur endgültigen Inaktivierung in einem Vorgang der als *respiratory burst* bezeichnet wird, eliminiert. Dieser Vorgang setzt die intrazelluläre Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) und hypochloriger Säure (HOCL) voraus.

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung von *Listeria monocytogenes* der Einfluss von *fas apoptotic inhibitory molecule 3* (Faim3/Toso) auf die Granulozyten untersucht. Dieses Transmembranprotein wurde als anti-apoptotisch wirkendes Molekül auf aktivierten T-Zellen entdeckt (Hitoshi et al., 1998) und reduziert zusätzlich den Schwellenwert für die TNF $\alpha$  induzierte Apoptose (Nguyen et al., 2012; Nguyen et al., 2011). Kürzlich veröffentlichte Arbeiten beschreiben Toso als einen Rezeptor für IgM (Kubagawa et al., 2009; Shima et al., 2010) sowie die Internalisierung der Toso/IgM Komplexe (Vire et al., 2011). Im Fokus der Betrachtung standen die Phagozytose und die Induktion von ROS in Granulozyten.

## 4.1. Charakterisierung der *Toso*<sup>-/-</sup> Maus

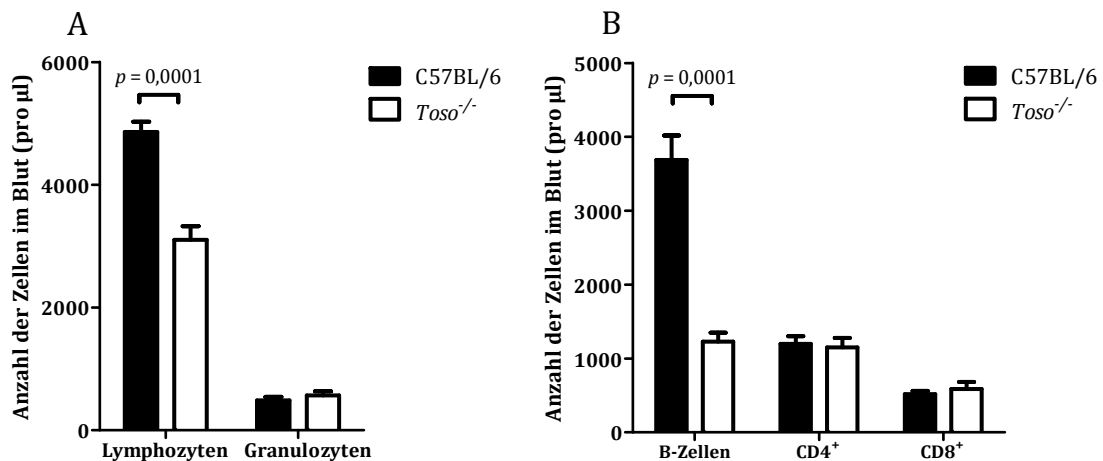
Die *Toso*<sup>-/-</sup> Maus wurde im Labor von Prof. Tak Mak (Toronto, Kanada) generiert und mehr als neun Generationen auf C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt. Die Deletion von *Toso* wurde sowohl auf DNA als auch auf RNA Ebene verifiziert (Abbildung 4.1.).



**Abbildung 4.1. Deletionsnachweis von *Toso* in der *Toso*<sup>-/-</sup> Maus** A) Genomische DNA wurde aus dem Gewebe der *Toso*<sup>-/-</sup> (-/-), Heterozygoten (+/-) sowie Kontroll C57BL/6 (+/+) Mäusen isoliert und die Deletion von *Toso* durch PCR bestätigt. Die Größe des PCR-Produkts der *Toso*<sup>-/-</sup> beträgt 400 bp und der C57BL/6 Kontrolle 450 bp. Zur Kontrolle der PCR wurde H<sub>2</sub>O eingesetzt. B-D) Aus der Milz und der Leber von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen wurde die Gesamt-RNA isoliert. B) Das quantitative *real time* PCR (qRT-PCR) Produkt von *Toso* und 18S wurde auf ein Agarosegel aufgetragen. In den ersten beiden Spuren ist das qRT-PCR Produkt von *Toso* und 18S der Milz und in Spur drei und vier der Leber dargestellt. C+D) Die Genexpression von *Toso* wurde in der qRT-PCR gemessen und als relative Expression ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) normiert auf 18S RNA als Referenzen angegeben (n=4).

In der Durchflusszytometrie wurde das periphere Blut von *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen mit dem Blut der C57BL/6 Mäuse hinsichtlich der Immunzellen verglichen. Während die Anzahl der Granulozyten keine signifikanten Unterschiede zeigte, konnte in *Toso* defizienten Tieren eine starke Reduktion an Lymphozyten detektiert werden (Abbildung 4.2.A). Die Verringerung der Lymphozyten beruhte im Wesentlichen auf einer über 50% niedrigeren Frequenz an B-Zellen, wohingegen die T-Zellen nicht betroffen waren (Abbildung 4.2.B).

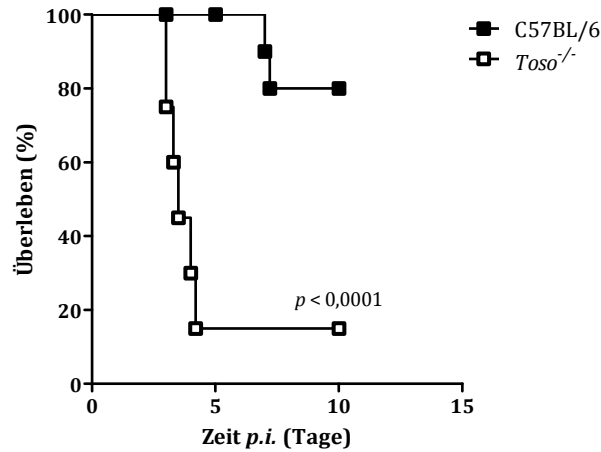




**Abbildung 4.2. Zusammensetzung des Blutes von naiven *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Die Leukozyten von C57BL/6 (schwarze Balken) sowie *Toso*<sup>-/-</sup>-Mäusen (weiße Balken) wurden in der Durchflusszytometrie quantifiziert. A) Lymphozyten wurden als Gesamtzahl von CD3<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Zellen errechnet. Granulozyten sind als Gr1<sup>hi</sup> CD11b<sup>hi</sup> definiert (n=6). B) Die Zusammensetzung der Anzahl der Lymphozyten in B-Zellen (CD19) sowie in T-Lymphozyten, welche aus T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) und T-Killerzellen (CD8<sup>+</sup>) bestehen (n=6) wurde quantifiziert.

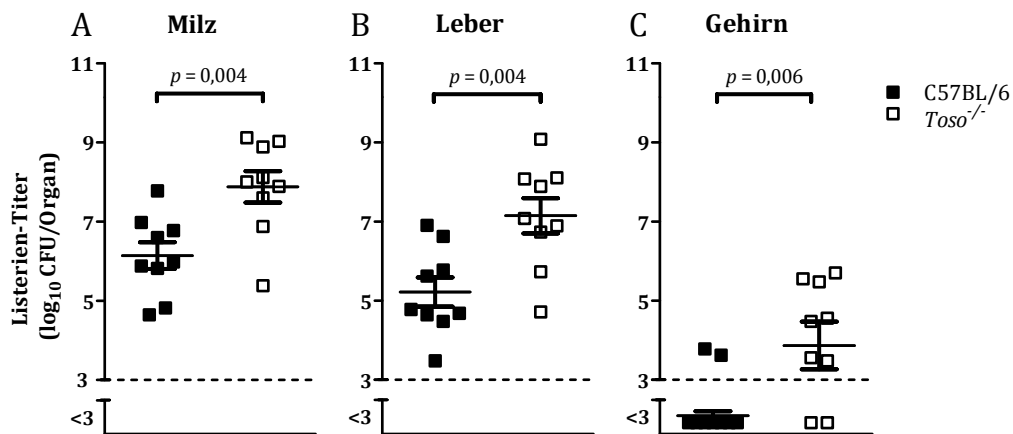
## 4.2. Erhöhte Suszeptibilität bei Defizienz von Toso während der Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Innerhalb der ersten Tagen einer systemischen Infektion mit dem gram-positiven Bakterium *Listeria monocytogenes* (Listerien) spielt vor allem das angeborene Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Eindämmung des Bakteriumwachstums. Dem adaptiven Immunsystem kommt erst im späteren Verlauf der Infektion bei der endgültigen Elimination der Bakterien eine Bedeutung zu (Navarini et al., 2006; Unanue, 1997). Der Einfluss von Toso für das Immunsystem wurde durch intravenöse Infektion mit einer sublethalen Dosis von 10<sup>4</sup> CFU Listerien in *Toso*<sup>-/-</sup> und C57BL/6 Mäusen überprüft und das Überleben der Tiere betrachtet. Während die Kontrolltiere die Infektion zu 80% überlebten, starben die meisten *Toso*<sup>-/-</sup> Mäuse in den ersten Tagen der Infektion (Abbildung 4.3.).



**Abbildung 4.3.** Überlebenskurve der *Toso*<sup>-/-</sup> Mäuse bei einer sublethalen Infektion mit *L. monocytogenes*. C57BL/6 (n=15 schwarz ■) und *Toso*<sup>-/-</sup> (n=8 weiß □) Mäuse wurden mit 10<sup>4</sup> CFU *L. monocytogenes* intravenös infiziert und das Überleben unter der Berücksichtigung von Abbruchkriterien (wie Belastung und Gewichtsverlust der Tiere) beobachtet. Die Infektion der Versuchstiere wurde in drei unabhängigen Versuchsansätzen durchgeführt.

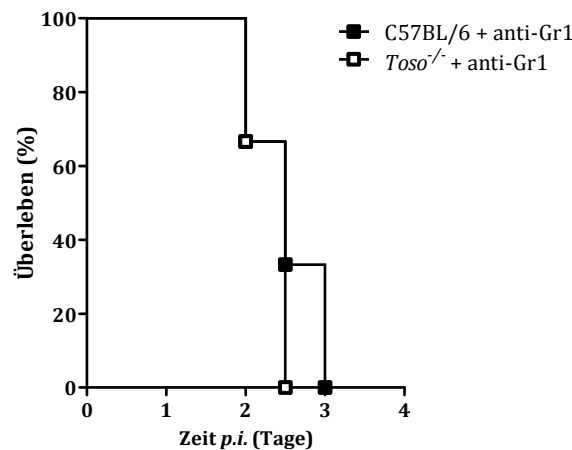
Desweiteren konnten in der Milz, Leber und im Gehirn bis zu 100fach höhere bakterielle Titer an Tag drei nach Infektion mit 10<sup>4</sup> CFU Listerien in *Toso* defizienten Mäusen verglichen mit den C57BL/6 Mäusen detektiert werden (Abbildung 4.4.).



**Abbildung 4.4.** Bakterientiter in den Organen. C57BL/6 (schwarz ■) und *Toso*<sup>-/-</sup> (weiß □) Mäuse wurden mit 10<sup>4</sup> CFU *L. monocytogenes* intravenös infiziert und an Tag drei getötet. Die Milz, Leber und das Gehirn wurden entnommen und die Titer im Gewebe bestimmt. Jeder Datenpunkt gibt den Titer für eine individuelle Maus wieder. Die durchgezogene Linie zeigt den Mittelwert der Gruppe und die gestrichelte Linie das Detektionslimit. In drei unabhängigen Ansätzen wurden jeweils drei Mäuse pro Gruppe infiziert (n=9).

Eine wichtige zelluläre Komponente zu Beginn der Infektion mit Bakterien sind Granulozyten, die durch Phagozytose und anschließender Eliminierung der Bakterien wesentlich dazu beitragen die Ausbreitung dieser zu verlangsamen (Rogers and Unanue,

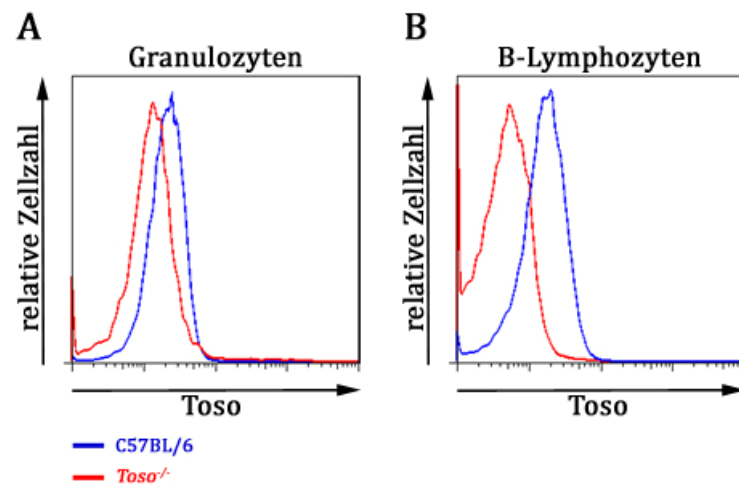
1993). Die Bedeutung der Granulozyten als antibakterielle Barriere wird durch die Behandlung mit einem spezifischen Depletionsantikörper (anti Gr-1) deutlich (Czuprynski et al., 1994). Die Depletion der Granulozyten verursachte in C57BL/6 Mäusen eine vergleichbare Suszeptibilität gegen die Infektion mit Listerien wie bei *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen, so dass beide Versuchsgruppen wenige Tage nach der Infektion verstarben (Abbildung 4.5.).



**Abbildung 4.5.** Überlebenskurve bei der Depletion von Granulozyten während der Infektion mit *L. monocytogenes*. C57BL/6 (n=3, schwarz ■) und *Toso*<sup>-/-</sup> (n=3, weiß □) Mäuse wurden zur Granulozytendepletion mit 200 µg anti-Gr1 (NimpR14) behandelt, um die Granulozyten zu depletieren. Am Folgetag wurden die Tiere mit 10<sup>4</sup> CFU *L. monocytogenes* intravenös infiziert. Das Überleben wurde unter der Berücksichtigung von Abbruchkriterien (wie Belastung und Gewichtsverlust der Tiere) beobachtet.

### 4.3. Toso Expression in Granulozyten

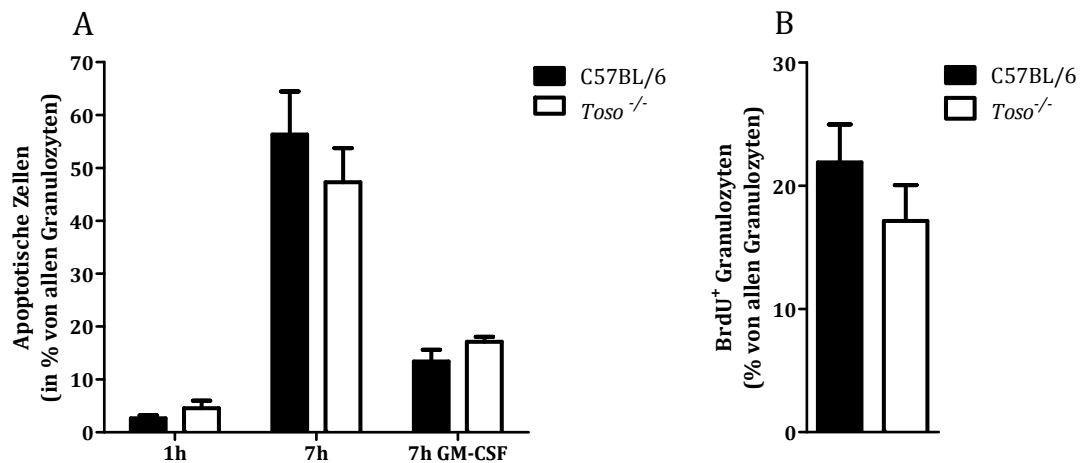
In den vergangenen Jahren konnte die Expression von Toso auf aktivierten T-Zellen sowie eine ubiquitäre Expression des Proteins auf B-Zellen nachgewiesen werden (Nguyen et al., 2011). Die Expressionsanalyse von Toso auf Granulozyten wurde in der Durchflusszytometrie mit einem Toso-spezifischen IgG anti-Maus Antikörper, welcher im Labor von Frau Kyeong-Hee Lee hergestellt wurde, durchgeführt (Nguyen et al., 2011; Vire et al., 2011). Toso defiziente Granulozyten fungierten hierbei als Negativkontrolle. Die aus dem Knochenmark isolierten Granulozyten des C57BL/6 Ursprungs exprimierten Toso (Abbildung 4.6.A). Die B-Zellen der Milz von *Toso*<sup>-/-</sup> und C57BL/6 Mäusen wurden zur Verifizierung der Expressionsanalysen verwendet und wiesen erwartungsgemäß eine Expression von Toso in den Kontrolltieren auf, wohingegen auf Toso defiziente B-Zellen keine Expression detektiert wurde (Abbildung 4.6.B).



**Abbildung 4.6. Oberflächenexpression von Toso.** A)  $10^6$  Knochenmarkszellen von C57BL/6 (blau) und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen (rot) wurden mit anti-Gr1 (Granulozyten) zusammen mit anti-Maus Toso Antikörper fluoreszenzgefärbt und in die Expression von Toso in der Durchflusszytometrie quantifiziert. B)  $10^6$  Splenozyten von C57BL/6 (blau) sowie *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen (rot) wurden mit anti-CD19 (B-Zellen) zusammen mit anti-Maus-Toso Antikörper fluoreszenzgefärbt und in die Expression von Toso in der Durchflusszytometrie quantifiziert. Tote Zellen wurden durch Verwendung von 7AAD ausgeschlossen.

#### 4.4. Toso unabhängige Regulation der Blutgranulozytenpopulation

Die Granulozyten im peripheren Blut besitzen eine Lebenszeitspanne von wenigen Stunden ehe diese einem Vorgang unterliegen, der als spontane Apoptose bezeichnet wird. Bei Kontakt mit Pathogenen sowie durch Wachstumsfaktoren wie GM-CSF verlängert sich die Lebenszeit auf bis zu zwei Tage (Brach et al., 1992; Colotta et al., 1992). Dieser Vorgang wurde *in vitro* durch die Verwendung von GM-CSF imitiert. Nach siebenständiger Inkubation ohne Stimulation starben über 50% der Granulozyten sowohl aus den C57BL/6 als auch aus den *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen, während die Stimulation mit GM-CSF die Apoptoserate in beiden Mausstämmen im gleichen Maß reduzierte (Abbildung 4.7.A).



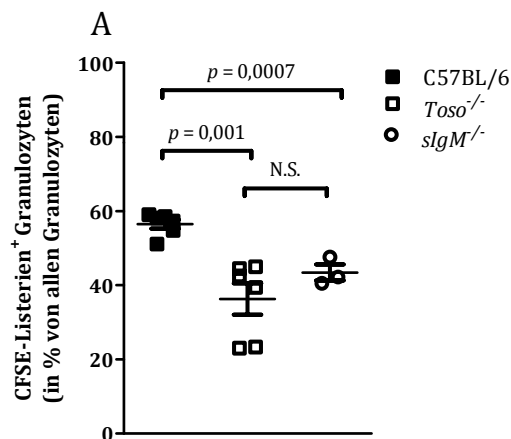
**Abbildung 4.7. Apoptose und Neubildung von Granulozyten.** A) Das Blut von C57BL/6 (schwarzer Balken) und *Toso*<sup>-/-</sup> (weißer Balken) Mäusen wurde bei 37°C inkubiert. Die Inkubation wurde für eine Stunde (spontane Apoptose) sowie für sieben Stunden mit oder ohne GM-CSF (40 ng/ml) durchgeführt. Anschließend wurde die Apoptose mittels AnnexinV / 7AAD Färbung in der Durchflusszytometrie analysiert (n=4). B) C57BL/6 (schwarzer Balken) und *Toso*<sup>-/-</sup> (weißer Balken) Mäusen wurde über einen Zeitraum von zwei Tagen alle 12 Stunden 2 mg BrdU gelöst in PBS intraperitoneal appliziert. Die Frequenz der BrdU<sup>+</sup> Granulozyten wurde am dritten Tag nach der Behandlung im Blut in der Durchflusszytometrie quantifiziert. Es wurden je Genotyp insgesamt fünf Mäuse in zwei unabhängigen Versuchsansätzen verwendet (n=10).

Die Granulozytenmenge wird durch Neubildung sowie der Migration der Granulozyten aus dem Knochenmark ins Blut erhalten und wurde in der Durchflusszytometrie untersucht. Hierzu wurde ein BrdU-Assay verwendet, welcher über den Einbau der Substanz in neusynthetisierte DNA die Zellteilung visualisiert. BrdU wurde über einen zweitägigen Zeitraum alle 12 Stunden intraperitoneal appliziert und die Frequenz der neugebildeten und ins Blut emigrierten Granulozyten in C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen am dritten Tag miteinander verglichen. Am Ende der Behandlung konnten annähernd 20% neugebildete Granulozyten in beiden Versuchsgruppen detektiert werden (Abbildung 4.7.B).

Die Regulation der Granulozytenmenge durch Apoptose und Neubildung zeigte keine Unterschiede in den beiden Genotypen, weswegen im Folgenden die Hauptmechanismen der antibakteriellen Funktion der Granulozyten untersucht wurden. Nach der Phagozytose von Pathogenen werden diese durch die Bildung von ROS innerhalb der Granulozyten eliminiert. Im folgenden Kapitel wurde zunächst die Phagozytose genauer untersucht.

## 4.5. Beeinträchtigte Phagozytose der Granulozyten bei Toso Defizienz

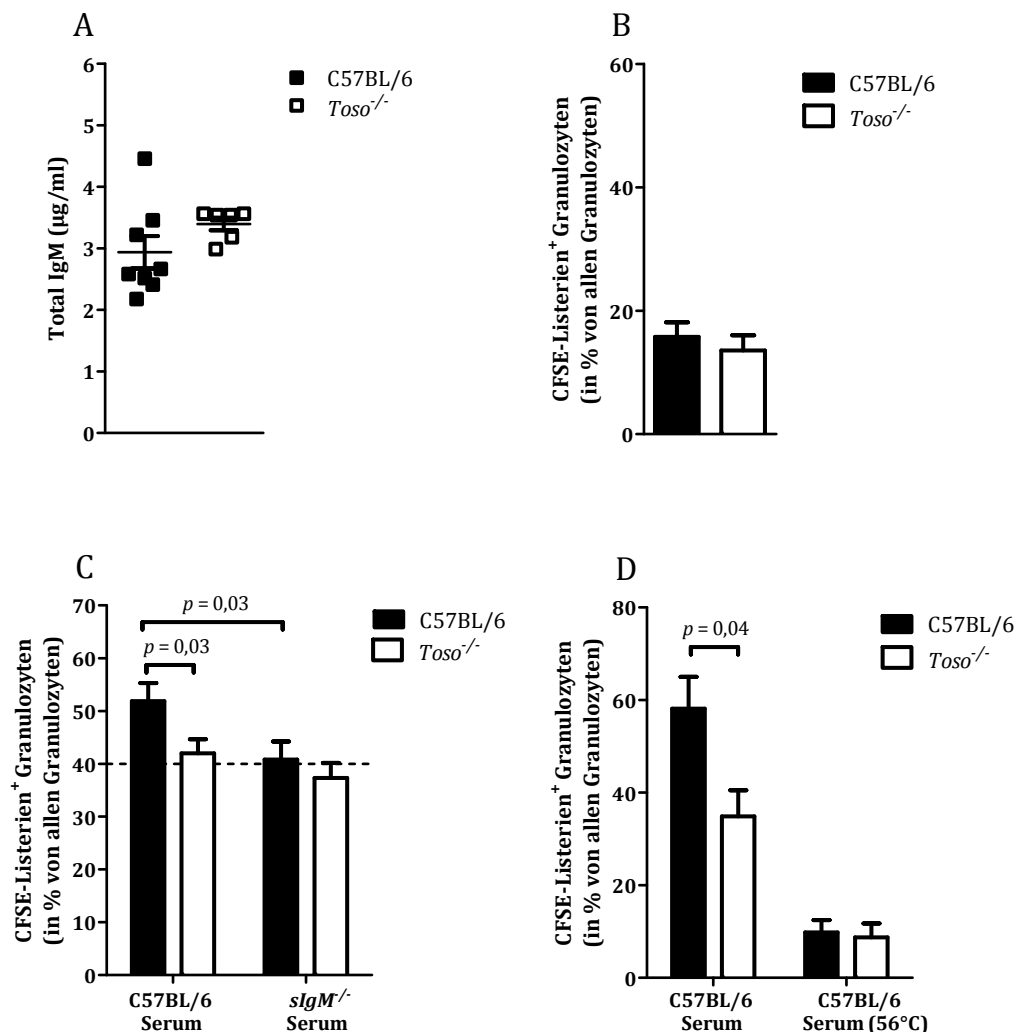
Nach Pathogenkontakt haben die Granulozyten die Aufgabe diese wirkungsvoll und schnell zu eliminieren. Über spezifische Rezeptoren wie Toll like Rezeptoren (TLR) werden die Pathogene erkannt und anschließend phagozytiert (Medzhitov, 2001). Neben dem Komplementsystem spielen auch natürlich vorkommende anti-Listerien-Antikörper der IgM-Klasse eine Rolle bei der Pathogenaufnahme (Ochsenbein et al., 1999; Schwartz et al., 2012). Zur Ermittlung des Phagozytosepotentials sowie zur Untersuchung des Einflusses von IgM auf den Phagozytoseprozess wurden in einem *in vitro* Assay Granulozyten aus dem peripheren Blut von *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen mit den Blutgranulozyten von Tieren ohne lösliches IgM (*slgM*<sup>-/-</sup>) sowie mit C57BL/6-Granulozyten verglichen. Nach einer einstündigen Inkubation mit 10<sup>6</sup> CFU Listerien, die mit CFSE angefärbt wurden (CFSE-Listerien), hatten knapp 60% der C57BL/6 Granulozyten Listerien phagozytiert und waren in der Durchflusszytometrie positiv für CFSE-Listerien (Abbildung 4.8.). *Toso* defiziente Granulozyten hatten zu 40% CFSE-Listerien aufgenommen und zeigten eine mit den Granulozyten aus *slgM*<sup>-/-</sup> Mäusen vergleichbare Phagozytose (Abbildung 4.8.).



**Abbildung 4.8. Phagozytosepotenzial von Listerien durch Granulozyten.** A) Peripheres Blut von C57BL/6 (schwarz ■), *Toso*<sup>-/-</sup> (weiß □) sowie *slgM*<sup>-/-</sup> (weiß ○; kein lösliches IgM) Mäusen wurde über einen Zeitraum von 60min mit 10<sup>6</sup> CFU CFSE-Listerien inkubiert und anschließend die Frequenz der CFSE-Listerien+ Granulozyten bezogen auf alle Granulozyten in der Durchflusszytometrie bestimmt. Jeder Datenpunkt gibt den Wert einer individuellen Maus wieder (n=3-6). Die durchgezogene Linie zeigt den Mittelwert der Gruppe.

Die Abbildung 4.8 zeigt eine verminderte Phagozytose von Granulozyten aus *Toso* und *slgM* defizienten Mäusen, weswegen IgM ELISA mit dem Serum von C57BL/6 sowie *Toso*<sup>-/-</sup>

Mäusen durchgeführt wurde. Die Konzentrationen an IgM-Antikörpern im Serum waren in den beiden Versuchsgruppen vergleichbar (Abbildung 4.9.A).

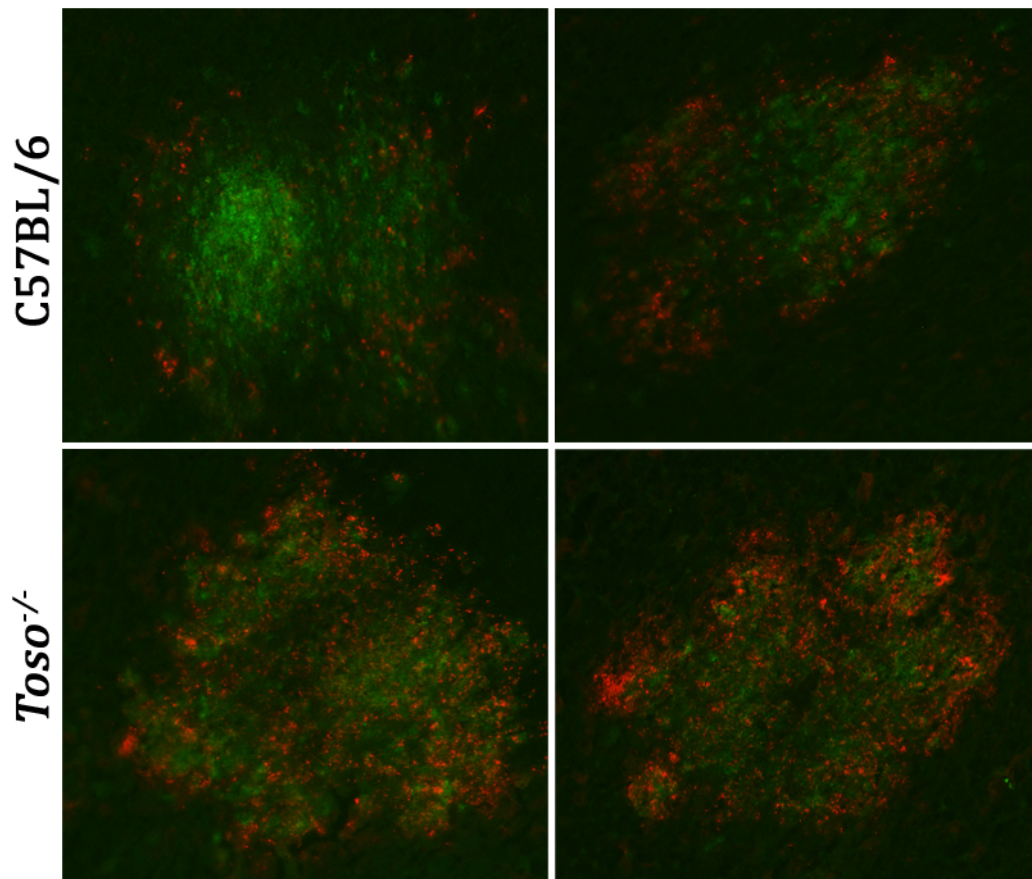


**Abbildung 4.9. IgM-abhängige Phagozytose von CFSE-Listerien.** A) Lösliches IgM wurde im Serum von C57BL/6 (schwarz ■) und *Toso*<sup>-/-</sup> (weiß □) Mäusen mittels ELISA quantifiziert. Die durchgezogene Linie gibt den Mittelwert der Gruppe wieder. Jeder Datenpunkt ist ein Wert einer individuellen Maus (n=6/Gruppe). B-D) Das Blut von C57BL/6 (schwarze Balken) und *Toso*<sup>-/-</sup> (weiße Balken) Mäusen wurde dreimal mit serumfreiem Medium zur Entfernung der humoralen Komponenten des Blutes gewaschen. B) 10<sup>6</sup> CFU CFSE-Listerien wurden im gewaschenen Blut für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die CFSE-Listerien<sup>+</sup> Granulozyten in Prozent von allen Granulozyten wurden in der Durchflusszytometrie bestimmt (n=10/Gruppe). C) 10<sup>6</sup> CFU CFSE-Listerien wurden für eine Stunde mit dem Serum (von Tag 3 nach Listerieninfektion) von C57BL/6 oder *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen vorinkubiert. Diese wurden anschließend für eine Stunde mit dem gewaschenen Blut von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen bei 37°C inkubiert. Die Analyse der CFSE-Listerien<sup>+</sup> Granulozyten in Prozent von allen Granulozyten erfolgte in der Durchflusszytometrie. Die horizontale Linie zeigt die IgM unabhängige Phagozytose. Das Experiment wurde mit 2 Mäusen pro Gruppe in fünf unabhängigen Ansätzen durchgeführt (n=10). D) 10<sup>6</sup> CFU CFSE-Listerien wurden für eine Stunde mit hitzeinaktiviertem (56°C) Serum von C57BL/6 oder Serum von *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen, jeweils an Tag drei nach Listerieninfektion entnommen, vorinkubiert. Diese wurden anschließend für eine Stunde mit dem gewaschenen Blut von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen bei 37°C inkubiert. Die Analyse der CFSE-Listerien<sup>+</sup> Granulozyten in Prozent von allen Granulozyten erfolgte in der Durchflusszytometrie (n=4/Gruppe).

Die Differenz in der Phagozytosekapazität zwischen *Toso*<sup>-/-</sup> und C57BL/6 Mäuse könnte jedoch durch weitere humorale Komponenten des Blutes verursacht sein und wurde im Einzelnen betrachtet. Die humoralen Komponenten wie Antikörper und die Bestandteile des Komplementsystems wurden durch dreimaliges Waschen des Blutes von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen entfernt. Die Granulozyten im gewaschenen Blut von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen wiesen daraufhin eine stark verringerte Phagozytose verglichen mit dem Granulozyten aus dem ungewaschenen Blut auf (Abbildung 4.8), jedoch war die Phagozytoserate in beiden Genotypen auf vergleichbarem Niveau (Abbildung 4.9.B).

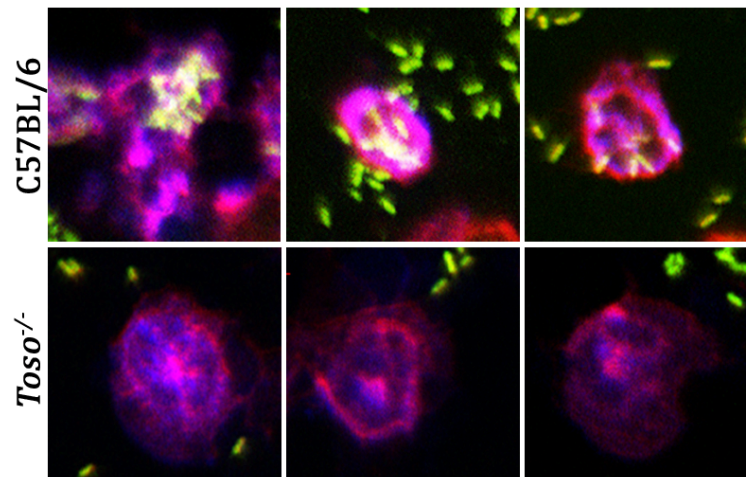
Der Einfluss von Toso im Zusammenhang mit IgM wurde mit den Granulozyten aus dem gewaschenen Blut näher untersucht. Die CFSE-Listerien wurden eine Stunde mit dem Serum von C57BL/6 oder *sIgM*<sup>-/-</sup> vorinkubiert bevor dieses Gemisch mit dem gewaschenen Blut von *Toso*<sup>-/-</sup> und C57BL/6 bei 37°C inkubiert wurde. Diese Vorbehandlung gewährleistete eine Opsonierung der Bakterien mit den humoralen Faktoren des Blutes einschließlich anti-IgM-Listerien Antikörpern (C57BL/6 Serum) oder ohne anti-IgM-Listerien Antikörpern (*sIgM*<sup>-/-</sup> Serum). Die Anwesenheit des löslichen IgMs im C57BL/6 Serum steigerte die Phagozytoserate der C57BL/6 Granulozyten um über 10% gegenüber den *Toso*<sup>-/-</sup> Granulozyten, während die Abwesenheit von IgM (*sIgM*<sup>-/-</sup> Serum) bei *Toso*<sup>-/-</sup> und C57BL/6 Granulozyten in einer vergleichbaren Phagozytose resultierte (Abbildung 4.9.C). Die Aufnahmekapazität der Granulozyten für Pathogene konnte jedoch maßgeblich unabhängig vom IgM detektiert werden (gestrichelte Linie; Abbildung 4.9.C). Neben den Immunoglobulinen übt das Komplementsystem einen Einfluss auf die Phagozytose aus. Das Komplementsystem wurde durch eine halbstündige Inkubation bei 56°C inaktiviert. Das hitzeinaktivierte C57BL/6 Serum wurde für eine Stunde mit CFSE-Listerien vorinkubiert und anschließend mit dem gewaschenen Blut von *Toso*<sup>-/-</sup> und C57BL/6 Granulozyten inkubiert. Die Depletion des Komplementsystems verringerte die Phagozytose von Bakterien in Granulozyten beider Genotypen auf unter 10% (Abbildung 4.9.D).





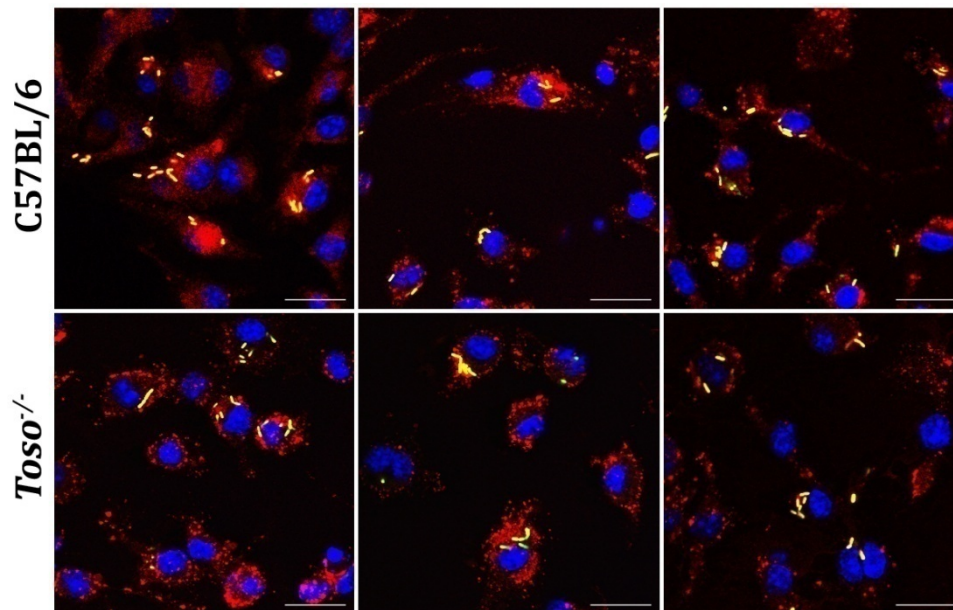
**Abbildung 4.10. Granulombildung in der Leber an Tag drei nach Listerieninfektion.** C57BL/6 (obere Zeile) und *Toso*<sup>-/-</sup> (untere Zeile) Mäuse wurden mit 10<sup>4</sup> CFU *L monocytogenes* infiziert und am dritten Tag der Infektion die Leber entnommen. Die Leberschnitte wurden zur Detektion der Granulozyten mit anti-Gr1 (grün) und die Listerien mit anti-Listerien Antikörpern (rot) fluoreszenzgefärbt. Gezeigt sind zwei repräsentative Ausschnitte von je zwei Mäusen pro Genotyp aus n=3 je Gruppe.

Bei einer systemischen bakteriellen Infektion bilden die ins Gewebe einwandernden Granulozyten Zellhaufen aus hunderten Granulozyten, die als Granulome bezeichnet werden. *In vivo* migrierten die Granulozyten in C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag drei nach Infektion mit 10<sup>4</sup> CFU Listerien in die Leber und formierten sich zu vergleichbaren Granulomen (Abbildung 4.10.). In den Lebern der C57BL/6 Mäuse wurden in der Immunfluoreszenzfärbung verglichen mit den Lebern aus *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen deutlich weniger Listerien detektiert (Abbildung 4.10). Die Verteilung der Listerien wies in beiden Genotypen einen deutlichen Unterschied auf. Bei den Kontrolltieren waren die Listerien vorwiegend um die Granulome konzentriert, wohingegen bei den *Toso* defizienten Mäusen die Listerien überwiegend innerhalb der Granulome konzentriert waren (Abbildung 4.10).



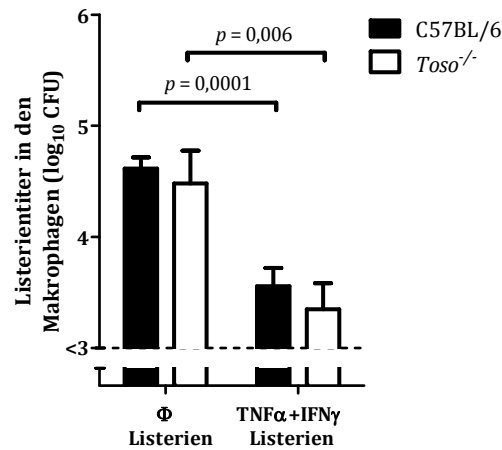
**Abbildung 4.11. Konfokale Aufnahme listerienphagozytierender Granulozyten.** Das Blut von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen wurde *in vitro* mit 10<sup>6</sup> CFU CFSE-Listerien zwei Stunden in Gegenwart bakteriostatischer Antibiotika bei 37°C inkubiert. Anschließend an die Fixierung wurde das Blut auf Objektträger zentrifugiert und konfokal mikroskopiert. In blau sind die Granulozyten (anti-Gr1), in rot CD11b (anti-CD11b) und in grün die CFSE-Listerien fluoreszenzgefärbt (n=3)

Die Makrophagen üben als phagozytierende Zellpopulation einen erheblichen Einfluss auf den Verlauf einer viralen und bakteriellen Infektion aus (Conlan, 1996). Die Listerienphagozytose der Granulozyten wurde zudem mit der von Makrophagen in der konfokalen Mikroskopie verglichen. Aus dem Knochenmark von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen wurden unter dem Einfluss von M-CSF als Differenzierungsstimulus Makrophagen *in vitro* generiert. Die Makrophagen sowie die Blutgranulozyten beider Genotypen wurden *in vitro* mit 10<sup>6</sup> CFSE-Listerien zwei Stunden inkubiert, die Zellen anschließend fixiert und auf Objektträger zentrifugiert. Verglichen mit C57BL/6 konnte in *Toso* defizienten Granulozyten kaum aufgenommene Listerien detektiert werden (Abbildung 4.11.). Die Phagozytoserate der Makrophagen zeigte keinen Unterschied in Abwesenheit von *Toso* (Abbildung 4.12.).



**Abbildung 4.12. Phagozytosekapazität von Makrophagen während *in vitro* Inkubation mit Listerien.**  
 Das Knochenmark von C57BL/6 (obere Zeile) und *Toso*<sup>-/-</sup> (untere Zeile) Mäusen wurde isoliert und *in vitro* unter Verwendung von M-CSF primäre Makrophagen generiert. Diese wurden an Tag 10 nach Differenzierungsbeginn für 12 Stunden auf Cover-Slips ausgesät. Anschließend wurde das Kulturmedium gewechselt und die Makrophagen zwei Stunden in Anwesenheit von bakteriostatischen Antibiotika mit 10<sup>6</sup> CFU CFSE-Listerien inkubiert und eine Fluoreszenzfärbung durchgeführt. Die Makrophagen sind (rot), der Zellkern (DAPI, blau) und die CFSE-Listerien (grün) dargestellt.

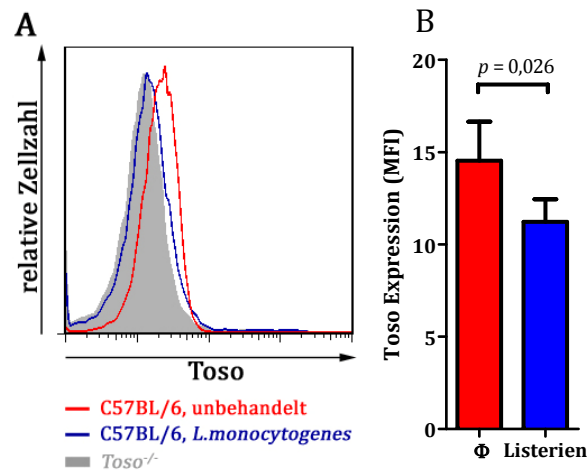
Dieses Ergebnis für die Makrophagen wurde zusätzlich durch ein weiteres Phagozytose- und Eliminierungsexperiment bestätigt. Die aus dem Knochenmark von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen generierten Makrophagen wurden entweder 12 Stunden mit TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  voraktiviert, um die Effektormechanismen für die intrinsische Eliminierung der Listerien in den Makrophagen zu verstärken, oder blieben unbehandelt. Die Makrophagen wurden anschließend zwei Stunden mit 10<sup>5</sup> CFU Listerien inkubiert und die intrazellulären Listerientiter bestimmt. Die nicht aktivierten Makrophagen beider Genotypen phagozytierten vergleichbare Mengen an Listerien (Abbildung 4.13.). Die Voraktivierung mit frühinflammatorischen Zytokinen konnte die Effektorfunktion der Makrophagen steigern, so dass die Konzentration an replikationsfähigen Listerien in den Makrophagen um Faktor 10 sowohl in C57BL/6 als auch in *Toso*<sup>-/-</sup> Makrophagen reduziert wurde (Abbildung 4.13.).



**Abbildung 4.13. Phagozytose und Eliminierung von Listerien durch Makrophagen.** Aus dem Knochenmark von C57BL/6 (schwarze Balken) und *Toso*<sup>-/-</sup> (weiße Balken) Mäusen wurden *in vitro* unter Verwendung von M-CSF Makrophagen generiert und an Tag zehn des Differenzierungsprozesses verwendet. 10<sup>5</sup> Makrophagen wurden für 12 Stunden ohne oder mit Stimulation durch TNFα und IFNγ in einer Platte ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit 10<sup>5</sup> CFU Listerien für zwei Stunden bei 37°C inkubiert und die Wells zur Entfernung nicht phagozytierter Listerien viermal mit Medium gewaschen. Durch zweiminütige Inkubation mit 50% Saponin wurden dann die Listerien aus den Makrophagen herausgelöst und die Titer bestimmt (n=12).

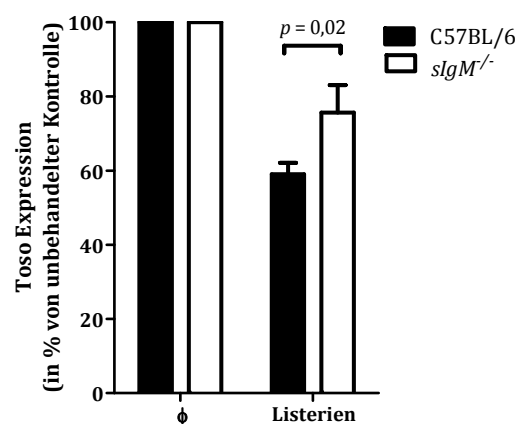
#### 4.6. Herunterregulierung von Toso durch Phagozytose

Die Phagozytose von Listerien ist sowohl von der Tosoexpression sowie vom IgM abhängig. Die Expressionsdynamik von Toso auf Granulozyten wurde folgend untersucht. Hierzu wurden Knochenmarkszellen von C57BL/6 mit und ohne Zugabe von 10<sup>8</sup> CFU Listerien inkubiert und die Expression von Toso auf Granulozyten in der Durchflusszytometrie quantifiziert. Nach der halbstündigen Inkubation mit Listerien konnte die Oberflächenexpression des Proteins bei C57BL/6 Granulozyten reduziert detektiert werden (Abbildung 4.14.).



**Abbildung 4.14. Expression von Toso bei der Phagozytose von Listerien.**  $10^6$  Knochenmarkszellen isoliert aus C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> wurden 30 min mit  $10^8$  *L. monocytogenes* inkubiert (blau) oder blieben unbehandelt (rot). Anschließend wurde eine Fluoreszenzfärbung mit anti-Maus Toso Antikörper und anti-Gr-1 durchgeführt. Tote Zellen wurden durch Verwendung von 7AAD ausgeschlossen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Knochenmarkszellen der *Toso*<sup>-/-</sup> Maus (grau schattiert) (n=5). A) Repräsentative Quantifizierung der Oberflächenexpression von Toso. B) Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der Expression von Toso bei C57BL/6 mit und ohne Inkubation mit Listerien.

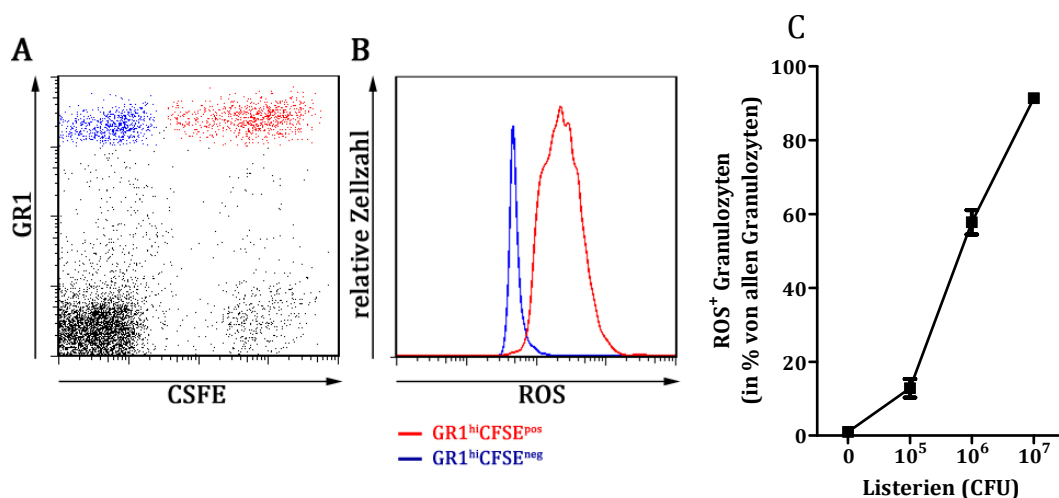
Die Phagozytose von Listerien konnte in C57BL/6 Mäusen unter dem förderlichen Einfluss von IgM detektiert werden, weswegen ein direkter Zusammenhang mit der Oberflächenexpression von Toso untersucht wurde. Die Knochenmarkszellen von C57BL/6 und *slgM*<sup>-/-</sup> Mäusen wurden nach einer halbstündigen Inkubation mit  $10^8$  CFU Listerien in der Durchflusszytometrie auf die relative Fluoreszenzintensität von Toso auf Granulozyten untersucht. Die Expression des Proteins verringerte sich auf C57BL/6 Granulozyten signifikant stärker als bei Verwendung der Granulozyten aus der *slgM*<sup>-/-</sup> Maus (Abbildung 4.15.).



**Abbildung 4.15. IgM abhängige Internalisierung von Toso bei der Phagozytose von Listerien.**  $10^6$  Knochenmarkszellen isoliert aus C57BL/6 (schwarze Balken) und *slgM*<sup>-/-</sup> (weiße Balken) wurden für 30 min mit  $10^8$  *L. monocytogenes* inkubiert oder blieben unbehandelt. Anschließend wurde eine Fluoreszenzfärbung mit anti-Maus Toso Antikörper und anti-Gr1 durchgeführt. Tote Zellen wurden mit 7AAD ausgeschlossen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Expression von Toso wurde in Prozent angegeben und auf die korrespondierende unbehandelte Kontrolle bezogen (n=8).

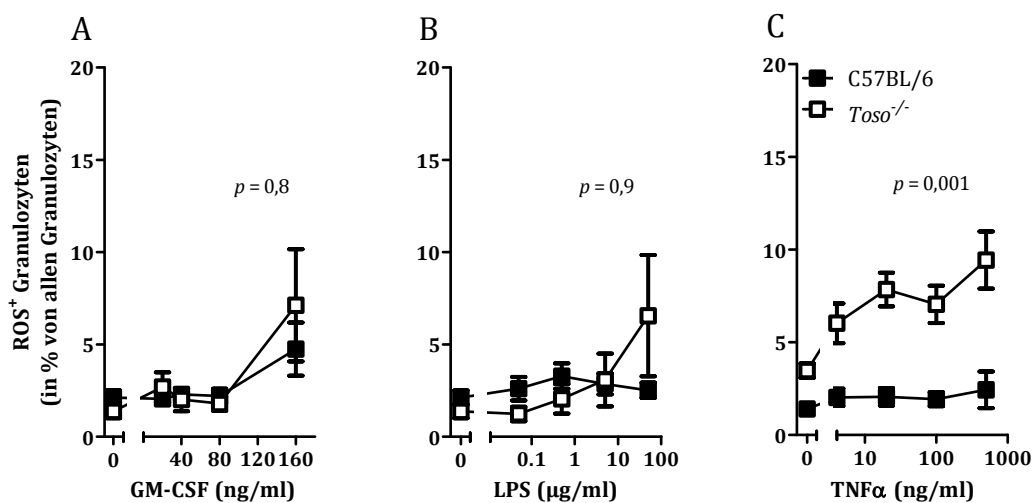
### 4.7. Fehlregulierte ROS-Synthese und Degranulation von Toso defizienten Granulozyten

Die phagozytierten Bakterien werden im Phagolysosom der Granulozyten durch die Generierung von radikalen Sauerstoffspezies (ROS) eliminiert (Segal et al., 1981). Die Verknüpfung von Phagozytose und der Bildung von ROS wurde folgend untersucht. Die Granulozyten aus dem peripheren Blut von C57BL/6 wurden mit  $10^6$  CFSE-Listerien inkubiert und die ROS-Synthese in Granulozyten, die Listerien aufgenommen hatten (Abbildung 4.16. A+B; rot) mit Granulozyten ohne Phagozytose von Listerien (Abbildung 4.16.A+B; blau) verglichen. Die Phagozytose der Listerien resultierte in der Produktion von ROS, wohingegen in Granulozyten, die keine Pathogene aufgenommen hatten, kaum ROS detektiert werden konnte (Abbildung 4.16.B). Der Zusammenhang beider Prozesse wird zudem durch Inkubation der Granulozyten mit ansteigenden Listerienkonzentrationen deutlich. In Abhängigkeit von der Pathogenlast konnte die ROS-Produktion bei der höchsten Listerienkonzentration auf nahezu 100% gesteigert werden (Abbildung 4.16.C).



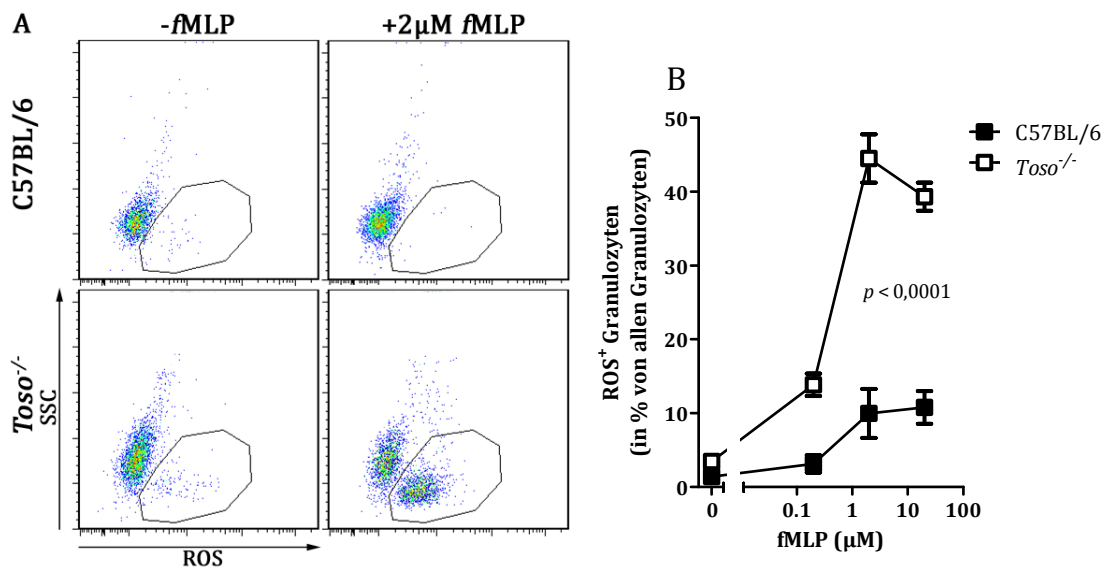
**Abbildung 4.16. Korrelation zwischen Phagozytose und ROS Produktion.** A+B) Peripheres Blut von C57BL/6 wurde mit  $10^6$  CFU CFSE-Listerien inkubiert und die ROS-Synthese mit Dihydroethidium (DHE) detektiert. Das linke Fenster (A) zeigt die Auftragung des Granulozytenmarkers (Gr1) gegen die CFSE-Listerien im DotPlot des Durchflusszytometers. Blaugefärbt ist die Population der Granulozyten, welche keine Pathogene aufgenommenen hatten, und in rot die phagozytierende Granulozytenpopulation dargestellt. Korrespondierend zur Darstellung in (A) zeigt das mittlere Histogramm (B) die intrazelluläre ROS-Synthese beider Zellpopulation. Ein Plot aus drei repräsentativen Experimenten ist gezeigt. C) Periphere Blut von C57BL/6 wurde eine Stunde mit  $10^5$ ,  $10^6$  oder  $10^7$  CFU Listerien inkubiert. Die ROS-Synthese der Granulozyten wurde in der Durchflusszytometrie mit Dihydrorhodamin (DHR) ermittelt. Als Kontrolle blieb eine Gruppe unbehandelt (n=4).

Die Effektorfunktionen von Granulozyten sind pathogenunspezifisch und basieren neben der Phagozytose und der intrazellulären Synthese von ROS auf der Degranulierung von in Granula gespeicherten antimikrobiellen Proteinen (Borregaard and Cowland, 1997; Lominadze et al., 2005). Die ROS-Synthese wird in zwei aufeinanderfolgenden Schritten, der Priming- und Aktivierungsphase streng reguliert, welche der Verhinderung von Gewebeschäden dienen (Clark et al., 1990; Dang et al., 1999). Das Eliminierungspotenzial der Zellen in der so genannten Aktivierungsphase, der eigentlichen ROS-Synthese, wird durch die vorrangingende Primingphase potenziert (Elbim et al., 1994; Morel et al., 1991). Das Priming allein löst jedoch keine Produktion von Sauerstoffradikalen aus.



**Abbildung 4.17. ROS-Synthese während der Primingphase.** Das periphere Blut von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen wurde mit verschiedenen Konzentrationen an GM-CSF, LPS oder TNFα eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die ROS-Synthese der Granulozyten in der Durchflusszytometrie mit Dihydrorhodamin (DHR) bestimmt und der prozentuelle Anteil der ROS produzierenden Granulozyten bezogen auf die Gesamtheit aller Blutgranulozyten erfasst (n=6).

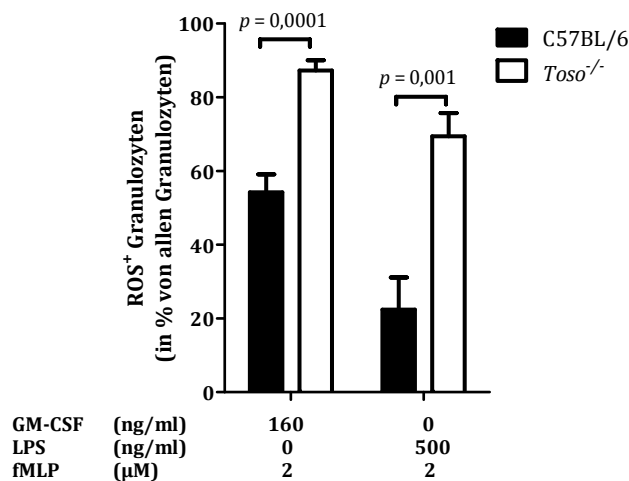
Die Synthese von ROS kann durch die Verwendung von Dihydrorhodamin (DHR) in der Durchflusszytometrie detektiert werden. Peripheres Blut von naiven C57BL/6 sowie *Toso* defizienten Mäusen mit verschiedenen Konzentrationen einiger Primingsubstanzen wie GM-CSF, LPS und TNFα behandelt und die ROS-Synthese in der Durchflusszytometrie erfasst. Während die Granulozyten des C57BL/6 Ursprungs auch bei hohen Konzentrationen der Primingsubstanzen kaum ROS produzierten, induzierte spezifisch TNFα in *Toso*<sup>-/-</sup> Zellen eine signifikante ROS-Synthese (Abbildung 4.17.).



**Abbildung 4.18. ROS-Synthese bei Inkubation mit dem Aktivator fMLP.** Das periphere Blut von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen wurde mit verschiedenen Konzentrationen an fMLP für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die ROS-Synthese in der Durchflusszytometrie mit Dihydrorhodamin (DHR) bestimmt. A) Repräsentative DotPlots der durchflusszytometrischen Analyse gated auf Granulozyten (Gr1<sup>+</sup>) von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen mit und ohne fMLP-Stimulation. B) ROS produzierende Granulozyten in Prozent aller Granulozyten bei ansteigenden Konzentration von fMLP (n=6).

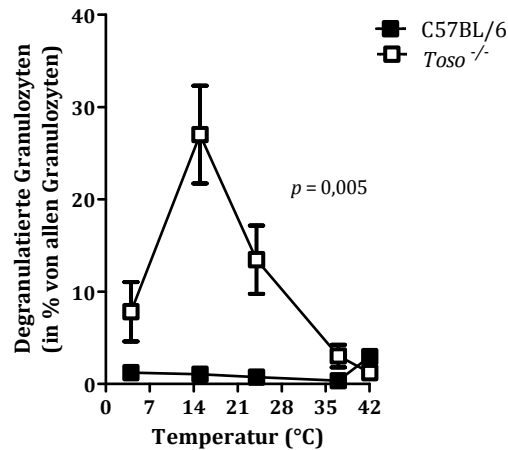
Die Primingphase ist für die Ausschöpfung der Effektorfunktion der Granulozyten entscheidend. Naive, nicht geprimte Granulozyten, welche direkt in Kontakt mit einer Aktivierungssubstanz kommen, produzieren kaum ROS. Der Pathogenkontakt kann *in vitro* mit fMLP (N-Formylmethionyl-Lencyl-Phenylalanin) imitiert werden, welches ein Bestandteile bakterieller Zellwände ist und an den fMLP Rezeptor (FPR) von Granulozyten bindet (Graves et al., 1992; Selvatici et al., 2006). Hohe Konzentrationen der Substanz konnten ohne vorrangegangener Priming-Phase bei ca. 10% der C57BL/6 Granulozyten ROS-Produktion induzieren (Abbildung 4.18). *Toso* defiziente Granulozyten reagierten signifikant stärker auf die Aktivierung mit fMLP. Bereits bei einer Konzentration von 2 µM fMLP konnte bei der Hälfte aller Granulozyten intrazelluläres ROS detektiert werden (Abbildung 4.18.A-rechte DotPlots; Abbildung 4.18.B.).





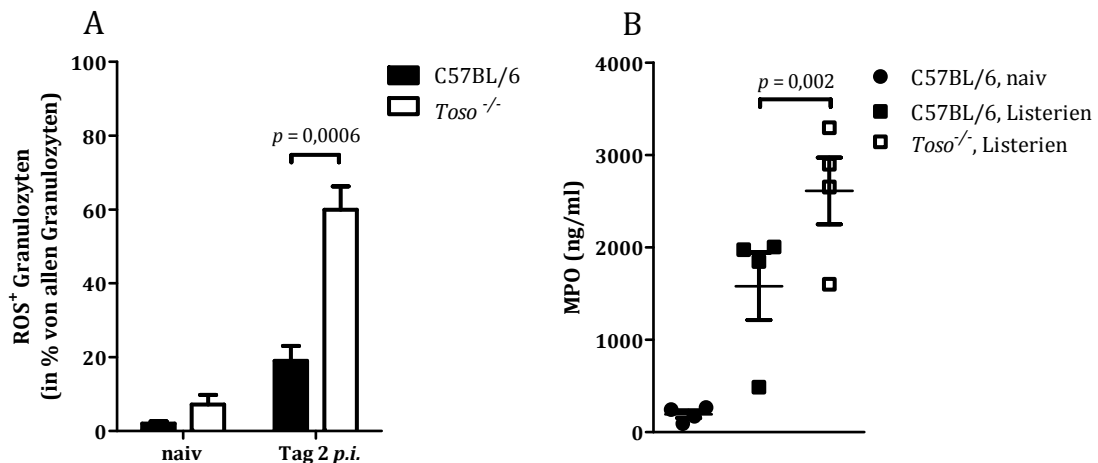
**Abbildung 4.19. *In vitro* induzierte ROS-Synthese nach der Priming- und Aktivierungsphase.** Peripheres Blut von C57BL/6 (schwarze Balken) und *Toso*<sup>-/-</sup> (weiße Balken) Mäusen wurde mit 160 ng/ml GM-CSF oder 500 ng/ml LPS eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 15 min mit 2 µM fMLP aktiviert. Die ROS-Synthese wurde in der Durchflusszytometrie mit Dihydrorhodamin (DHR) bestimmt und die ROS produzierenden Granulozyten in Prozent aller Blutgranulozyten angegeben (n=6).

Die bisher vorgestellten Daten zeigten, dass das Fehlen von Toso den Schwellenwert für die ROS-Synthese sowohl bei direkter Aktivierung mit fMLP als auch beim Priming mit TNF $\alpha$  verringerte, jedoch keinen Einfluss bei GM-CSF und LPS ausübte. Das Verhalten bei Priming und anschließender Aktivierung wurde *in vitro* mit den beiden Priming-Substanzen GM-CSF und LPS untersucht. Diese wurden gewählt, da sie bei Toso Defizienz während der Primingphase keinen Unterschied in der ROS-Synthese verglichen mit den Kontrolltieren aufgewiesen hatten. Über einen Zeitraum von 30min wurde die Granulozyten im peripheren Blut von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen mit GM-CSF oder LPS geprimt und anschließend mit 2µM fMLP aktiviert. Die Granulozyten vom C57BL/6 Ursprung produzierten bei der Induktion der ROS-Synthese mit GM-CSF und fMLP zu knapp 50% ROS, wohingegen der Anteil an ROS produzierenden Granulozyten bei Toso Defizienz signifikant größer war (Abbildung 4.19.). Die selbe Beobachtung konnte beim Priming mit LPS und anschließender Aktivierung durch fMLP gemacht werden (Abbildung 4.19).



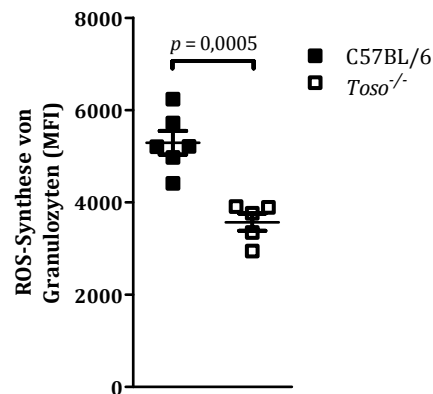
**Abbildung 4.20. Temperatursensitivität der Granulozyten.** Das Blut von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen wurde für 30 min bei 4°C, 15°C, 24°C, 37°C und 42°C inkubiert. Die Degranulation der Granulozyten wurde in der Durchflusszytometrie durch eine Verringerung der Granularität des Durchflusszytometers (SSC) bestimmt. Degranulierte Granulozyten sind in Prozent aller Granulozyten angegeben (n=6).

Zellulärer Stress wie zum Beispiel Hitzeschock kann zur Aktivierung und Degranulation der Granulozyten führen (Werz et al., 2002). Unter physiologischen Bedingungen trägt diese Art von Stimulation zu autoinflammatorischen Erkrankungen bei (Nathan, 2006). Zur Untersuchung der Thermorelevanz der Zellen wurden Granulozyten beider Genotypen für 30 min unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt und die Aktivierung anhand der Degranulation quantifiziert. Granulozyten des C57BL/6 Ursprungs tolerierten die Temperaturschwankungen des gesamten Untersuchungsbereichs von 4°C bis 42°C, während *Toso* defiziente Granulozyten bereits bei minimalen Schwankungen degranulierten. Eine Reduktion der Temperatur von 37°C auf 14°C führte bei *Toso* defizienten Granulozyten zu einer 30%igen Degranulation, während Zellen des C57BL/6 Ursprungs keine Reaktion zeigten (Abbildung 4.20.).



**Abbildung 4.21. *In vivo* ROS-Synthese und Degranulation während einer Listerieninfektion.** A) C57BL/6 (schwarze Balken) und *Toso*<sup>-/-</sup> (weiße Balken) Mäuse wurden mit 10<sup>4</sup> CFU *L. monocytogenes* (Listerien) infiziert und das Blut an Tag 2 *p.i.* entnommen. Naives Blut beider Genotypen wurde als Kontrolle verwendet. Die ROS-Synthese wurde in der Durchflusszytometrie unter Verwendung von Dihydrorhodamin (DHR) gemessen und die ROS produzierenden Granulozyten in Prozent aller Granulozyten angegeben (n=4-5). B) Die Konzentration von MPO im Plasma wurde mittels ELISA von uninfizierten C57BL/6 (schwarz ●) und von C57BL/6 (schwarz ■) sowie *Toso*<sup>-/-</sup> (weiß □) Mäusen sechs Stunden nach der Infektion mit 10<sup>6</sup> CFU *L. monocytogenes* analysiert. Jeder Datenpunkt gibt den Wert eines individuellen Tieres wieder (n=4/Gruppe). Die horizontale Linie stellt den Mittelwert der Gruppe dar.

*In vitro* zeigten *Toso* defiziente Granulozyten sowohl einen verminderten Schwellenwert für die ROS-Synthese als auch eine verringerte Stresssensitivität. Die Hypersensitivität *Toso* defizienter Granulozyten wurde zusätzlich *in vivo* betrachtet. Hierzu wurden *Toso*<sup>-/-</sup> und C57BL/6 Mäuse mit 10<sup>4</sup> CFU Listerien infiziert und im Blut die ROS-Synthese und die Degranulation von Granulozyten an Tag zwei nach der Infektion untersucht. Während der prozentuale Anteil der ROS produzierenden Granulozyten bei *Toso* Defizienz bei über 60% lag, wiesen ein deutlich geringer Anteil der Blutgranulozyten der C57BL/6 Mäusen ROS-Synthese auf (Abbildung 4.21.A). Die erhöhte ROS-Synthese im Blut von *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen korrelierte mit einer signifikant höheren Freisetzung der Myeloperoxidase (MPO) ins Blut, einem Protein welches in Granula der Granulozyten gespeichert ist und als Marker für die Degranulation herangezogen werden kann (Abbildung 4.21.B).

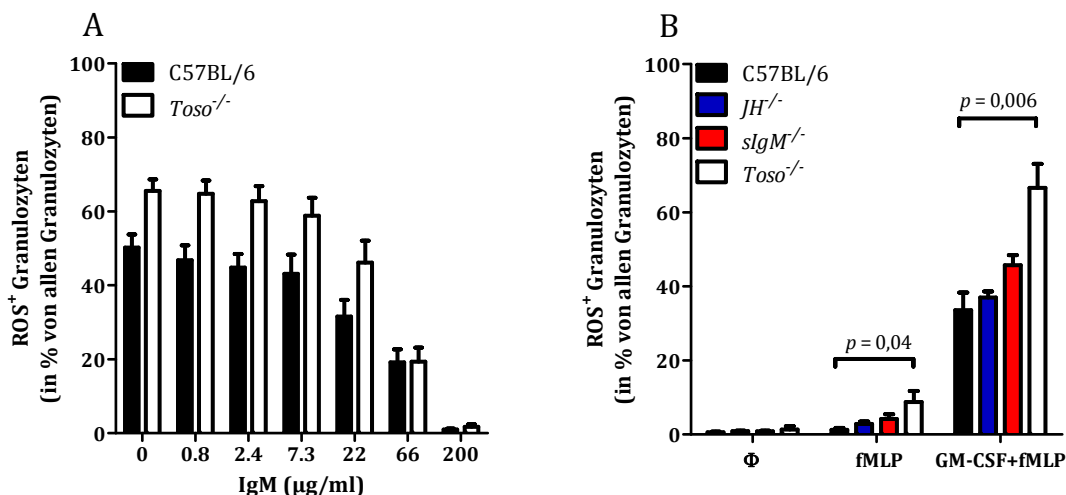


**Abbildung 4.22. ROS-Synthese in Granulozyten der Milz.** C57BL/6 (schwarz ■) und *Toso*<sup>-/-</sup> (weiß □) Mäuse wurden mit 10<sup>4</sup> CFU *L. monocytogenes* intravenös infiziert und die Milzen 24 Stunden später entnommen. Die ROS-Synthese der Granulozyten wurde in der Durchflusszytometrie unter der Verwendung von Dihydrorhodamin (DHR) quantifiziert und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von DHR dargestellt (n=5-6 je Gruppe). Jeder Datenpunkt gibt den Wert eines individuellen Tieres wieder. Die horizontale Linie stellt den Mittelwert der Gruppe dar.

*Toso* defiziente Blutgranulozyten zeigten verglichen mit C57BL/6 *in vivo* im Blut erhöhte ROS-Synthese und verstärkte Degranulation. Die Aktivierung der Granulozyten ist in den Organen für das Überleben entscheidend. In der Milz wurde daher die ROS Synthese der Granulozyten 24 Stunden nach der Infektion mit Listerien von *Toso*<sup>-/-</sup> und C57BL/6 Mäusen in der Durchflusszytometrie untersucht. Die Granulozyten des C57BL/6 Ursprung zeigten verglichen mit *Toso* defizienten Zellen eine deutlich höhere ROS-Synthese (Abbildung 4.22.).

Der Phagozytoseprozesse von Listerien ist unter anderem vom löslichen IgM abhängig (Abbildung 4.9). Der Zusammenhang von IgM mit der ROS-Synthese sowie der Expression von *Toso* wurde folgend untersucht. Hierzu wurde peripheres Blut von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen zunächst zur Entfernung aller humoralen Faktoren dreimal mit serumfreien Medium gewaschen. Anschließend wurden die Blutzellen in Gegenwart unterschiedlicher IgM-Konzentrationen mit GM-CSF geprimt und folgend mit fMLP aktiviert. Die ROS-Synthese der Granulozyten wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Die Titration von IgM zeigte bei allen Konzentrationen sowohl bei *Toso*<sup>-/-</sup> als auch C57BL/6 Blutgranulozyten einen vergleichbaren Einfluss, wobei die Substitution mit 200 µg/ml IgM die Phagozytoserate der Zellen beider Genotypen auf annähernd null Prozent senkte (Abbildung 4.23.A). Die Abhängigkeit der ROS-Synthese von löslichem IgM wurde zudem mit dem Blut von Tieren defizient für lösliches IgM (*sIgM*<sup>-/-</sup>) und für reife B-Zellen (*JH*<sup>-/-</sup>) analysiert sowie mit den Granulozyten von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen (Abbildung 4.23.B). Die Granulozyten keiner der getesteten Deletionsmäusen konnte eine mit den *Toso*<sup>-/-</sup> Granulozyten vergleichbare, erhöhte ROS-Synthese aufweisen (Abbildung

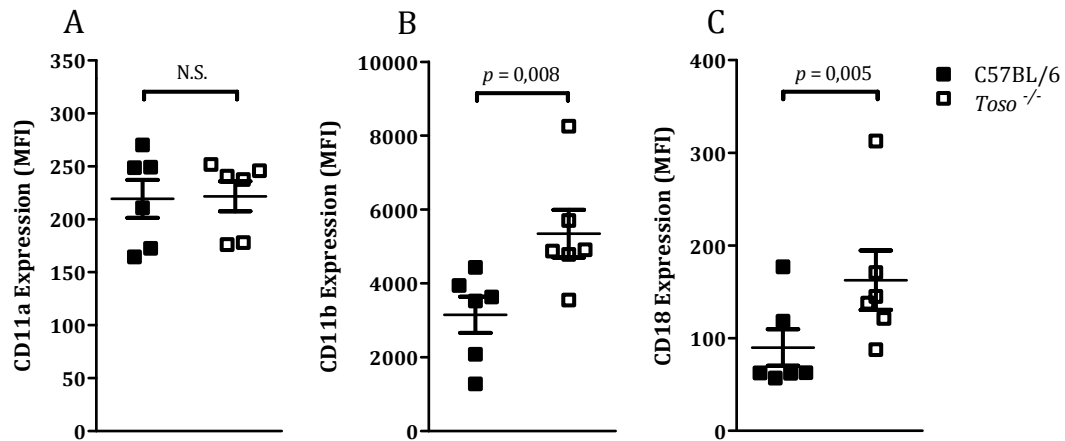
4.23.B). Toso defiziente Granulozyten zeigten sowohl bei der direkten Aktivierung mit fMLP als auch bei der Aktivierung anschließend an das Priming signifikant erhöhte ROS-Produktion.



**Abbildung 4.23. Der Einfluss von IgM auf die ROS-Synthese der Granulozyten.** A) Peripheres Blut von C57BL/6 (schwarze Balken) und *Toso*<sup>-/-</sup> (weiße Balken) Mäusen wurde zur Entfernung von humoralen Komponenten des Blutes dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen. Das gewaschene Blut wurde in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an murinem IgM mit 160 ng/ml GM-CSF eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an das Priming wurden die Granulozyten mit 2 µM fMLP weitere 15 min bei 37°C aktiviert. Die ROS-Synthese wurde in der Durchflusszytometrie unter Verwendung von DHR quantifiziert und die ROS produzierenden Granulozyten in Prozent aller Granulozyten angegeben (n=7). B) Das Blut von C57BL/6 (schwarz), *Toso*<sup>-/-</sup> (weiß), *sIgM*<sup>-/-</sup> (rot) und *JH*<sup>-/-</sup> (blau) wurde mit oder ohne GM-CSF (160 ng/ml) und mit oder ohne fMLP (2 µM) aktiviert. Die ROS produzierenden Granulozyten wurden in der Durchflusszytometrie mittels DHR detektiert und in Prozent aller Granulozyten angegeben (n=4 pro Gruppe).

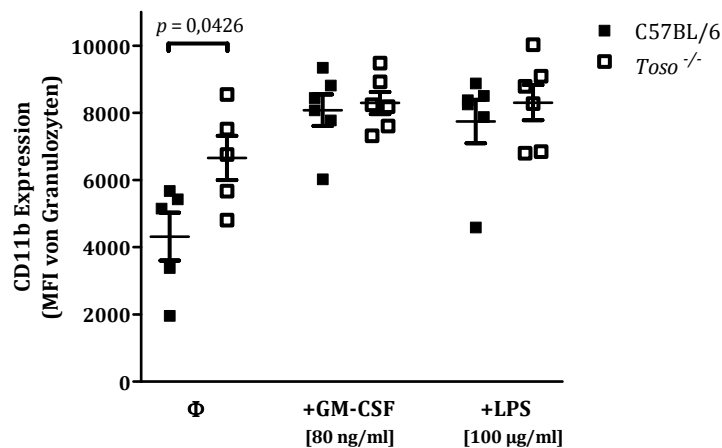
## 4.8. Toso beeinflusst den Aktivierungszustand der Granulozyten

Die Ausführung der Effektorfunktionen von Granulozyten ist abhängig von deren Aktivierung. Ein wichtiger Marker zur Ermittlung des Aktivierungszustandes der Zellen ist der Komplement 3 Rezeptor (C3R), welcher sich als Heterodimer aus den Untereinheiten CD11b und CD18 zusammensetzt (Anderson et al., 2008; Mazzone and Ricevuti, 1995). Anhand der Oberflächenexpression der Marker auf Granulozyten wurde der Aktivierungszustand im naiven Blut analysiert. Hierzu wurde das Blut von C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen direkt nach der Entnahme mit Formalin fixiert und die Expression von CD11a, CD11b und CD18 im Durchflusszytometer quantifiziert. Toso defiziente Granulozyten zeigten verglichen mit den Kontroll-Granulozyten aus C57BL/6 Mäusen eine signifikant höhere Expression von CD11b und CD18 (Abbildung 4.24.B-C), wohingegen das zur Kontrolle gemessene Integrin CD11a keinen Unterschied aufwies (Abbildung 4.24.A).



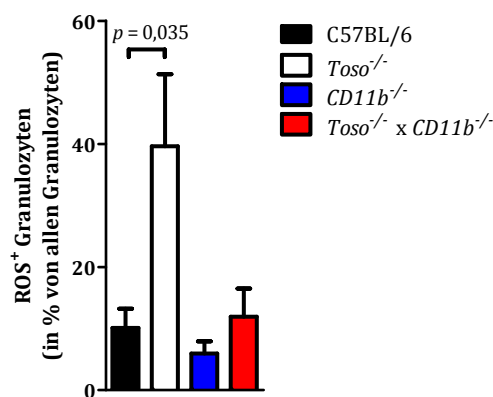
**Abbildung 4.24. Expression von Integrinen auf naiven Blutgranulozyten.** Das periphere Blut von C57BL/6 (schwarz ■) und *Toso*<sup>-/-</sup> (weiß □) Mäusen wurde direkt nach der Entnahme mit 2% Formalin/PBS fixiert. Die Granulozyten wurden mit anti-CD11a, anti-CD11b oder anti-CD18 fluoreszenzgefärbt und die mittlere Fluoreszenzintensität in der Durchflusszytometrie quantifiziert. Jeder Datenpunkt ist der Wert einer individuellen Maus und die horizontale Linie gibt den Mittelwert der Gruppe an (n=6).

Die Regulation der Oberflächenexpression von CD11b als Aktivierungsmarker von Granulozyten wurde in Abhängigkeit vom Priming näher untersucht. Hierzu wurde das periphere Blut *Toso* defizienter sowie C57BL/6 Tiere mit ansteigenden Konzentrationen von GM-CSF und LPS inkubiert. Die Blutgranulozyten von C57BL/6 erreichten durch das Priming mit beiden Substanzen ein mit *Toso* defizienten Granulozyten vergleichbares relatives Expressionslevel von CD11b (Abbildung 4.25.).



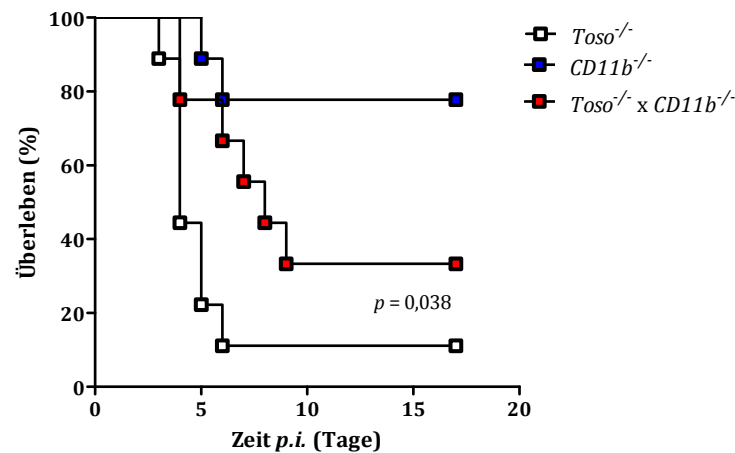
**Abbildung 4.25. Expression von CD11b nach dem Priming mit GM-CSF und LPS.** Peripheres Blut von C57BL/6 (schwarz ■) und *Toso*<sup>-/-</sup> (weiß □) Mäusen wurde eine halbe Stunde bei 37°C in Gegenwart von 80 ng/ml GM-CSF bzw. 100 µg/ml LPS inkubiert. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Expression von CD11b auf Granulozyten wurde in der Durchflusszytometrie quantifiziert. Jeder Datenpunkt ist der Wert einer individuellen Maus und die horizontale Linie gibt den Mittelwert an (n=5-6).

Die Oberflächenexpression Toso defizienter Granulozyten zeigte bereits ohne Voraktivierung erhöhte Level des Aktivierungsmarkers CD11b (Abbildung 4.24.; Abbildung 4.25). Der Einfluss der Integrinexpression auf die Regulation des Induktionsschwellenwerts für die Synthese von ROS wurde in der Doppel-Mutante (*Toso*<sup>-/-</sup> x *CD11b*<sup>-/-</sup>) untersucht. Das periphere Blut von C57BL/6, *Toso*<sup>-/-</sup>, *CD11b*<sup>-/-</sup> sowie *Toso*<sup>-/-</sup> x *CD11b*<sup>-/-</sup> wurde 30 min mit GM-CSF bei 37°C geprimt und anschließend 15 min mit fMLP aktiviert. Im Anschluss wurde die ROS-Synthese im Durchflusszytometer analysiert. Der Anteil der ROS produzierenden Granulozyten bei *CD11b*<sup>-/-</sup> Defizienz war mit C57BL/6 Granulozyten vergleichbar, wohingegen die *Toso*<sup>-/-</sup> Granulozyten ähnlich zu vorigen Experimenten signifikant höhere Frequenzen ROS produzierter Zellen aufwiesen (Abbildung 4.26.C). Die ROS-Generierung der Granulozyten reduzierte sich bei der Doppel-Mutante *Toso*<sup>-/-</sup> x *CD11b*<sup>-/-</sup> deutlich gegenüber *Toso*<sup>-/-</sup> Granulozyten und war vergleichbar mit den Granulozyten vom C57BL/6 Ursprung (Abbildung 4.26.C).



**Abbildung 4.26. Einfluss der CD11b-Expression auf die Effektorfunktion von Granulozyten.** Das periphere Blut von C57BL/6 (schwarze Balken), *Toso*<sup>-/-</sup> (weiße Balken), *CD11b*<sup>-/-</sup> (blaue Balken) sowie *Toso*<sup>-/-</sup> x *CD11b*<sup>-/-</sup> (rote Balken) wurde mit 160 ng/ml GM-CSF eine halbe Stunde bei 37°C geprimt. Zur Aktivierung wurde die Inkubation für 15min mit 2 µM fMLP fortgesetzt. Die ROS-Synthese wurde in der Durchflusszytometrie unter Verwendung von DHR quantifiziert und die ROS produzierenden Granulozyten als prozentualer Anteil aller Granulozyten angegeben (n=4).

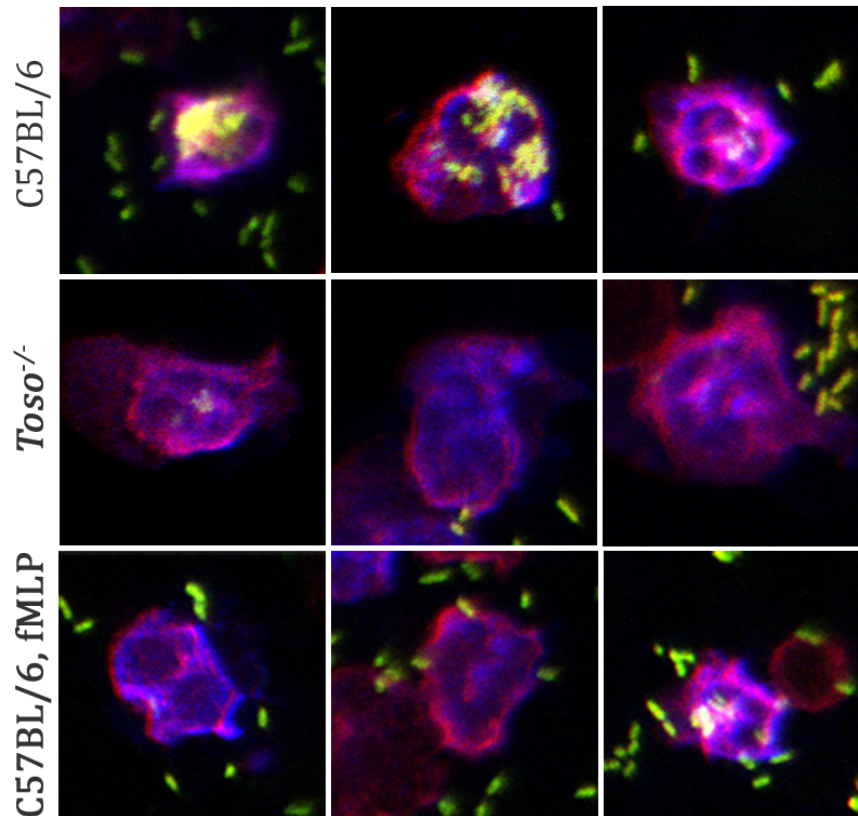
Die Defizienz des Integrins CD11b verringerte *in vitro* die ROS-Synthese von *Toso*<sup>-/-</sup> Granulozyten auf das Level von C57BL/6 Granulozyten. Die Auswirkung der Deletion von CD11b *in vivo* wurde bei einer Listerieninfektion näher betrachtet. Hierzu wurden *Toso*<sup>-/-</sup> sowie *Toso*<sup>-/-</sup> x *CD11b*<sup>-/-</sup> Mäuse mit 10<sup>4</sup> CFU Listerien infiziert. Die *Toso*<sup>-/-</sup> x *CD11b*<sup>-/-</sup> Doppelmutante überlebte die Infektion zu knapp 40%, während 90% der Toso defizienten Mäuse verstarben (Abbildung 4.27.). Die *CD11b*<sup>-/-</sup> Maus diente als Kontrolle und verhielt sich wie C57BL/6 in der Abbildung 4.3.



**Abbildung 4.27. Überlebenskurve bei Defizienz von CD11b während einer Listerieninfektion.** *Tos0*<sup>-/-</sup> (weiß), *CD11b*<sup>-/-</sup> (blau) *Tos0*<sup>-/-</sup> x *CD11b*<sup>-/-</sup> (rot) Mäuse wurden mit 10<sup>4</sup> CFU *L. monocytogenes* intravenös infiziert, und das Überleben der Tiere unter Berücksichtigung der Abbruchkriterien (Belastung und Gewichtsverlust der Tiere) zeitabhängig verfolgt. Es wurden in drei unabhängigen Ansätzen jeweils drei Tiere pro Genotyp infiziert (n=9).

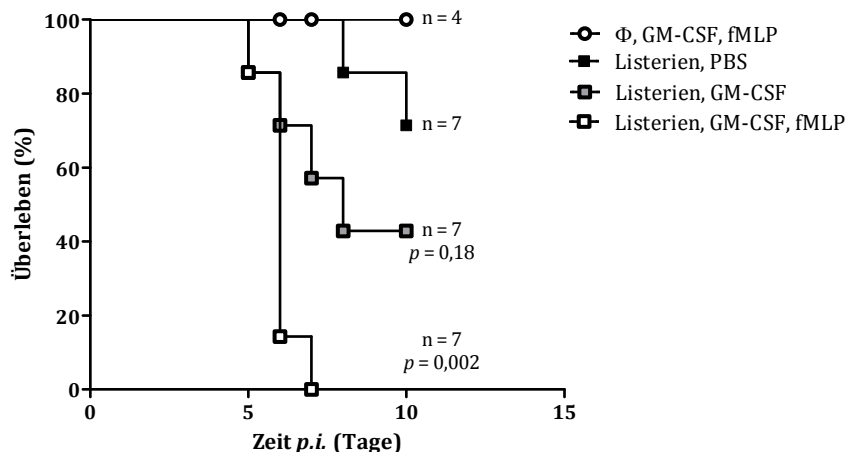
Die Auswirkungen einer Voraktivierung der Granulozyten auf die Phagozytose wurden *in vitro* in der konfokalen Mikroskopie untersucht. Die Blutgranulozyten von C57BL/6 wurden 20 min mit fMLP voraktiviert und die Phagozytose von CFSE-Listerien mit Blutgranulozyten naiver nicht geprimter C57BL/6 sowie *Tos0*<sup>-/-</sup> Tiere verglichen. Die Inkubation mit CFSE-Listerien wurde über einen Zeitraum von 2 Stunden durchgeführt und die Phagozytose der Pathogene nach der Fixierung und Zentrifugation der Zellen auf Objektträger konfokal mikroskopiert. *Tos0* defiziente Granulozyten zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren eine stark verminderte Aufnahme von Listerien (Abbildung 4.28.) Die Voraktivierung der C57BL/6 Granulozyten mit fMLP zeigte jedoch einen reduzierenden Effekt auf die Phagozytose der CFSE-Listerien (Abbildung 4.28)





**Abbildung 4.28. Phagozytosekapazität voraktivierter Blutgranulozyten.**  $10^6$  CFU CFSE Listerien wurden in Gegenwart von Antibiotika zwei Stunden mit dem Blut naiver, nicht aktivierter C57BL/6 (obere Zeile), *Toso*<sup>-/-</sup> (mittlere Zeile) sowie dem Blut von C57BL/6, welches zuvor 20min mit  $2 \mu\text{M}$  fMLP (untere Zeile) voraktiviert wurde, inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Blut umgehend fixiert und auf Objektträger zentrifugiert. Die Granulozyten wurden konfokal mikroskopiert und repräsentativ Ergebnisse von drei Versuchstieren dargestellt. Die Listerien sind in grün, die Granulozyten in blau und CD11b in rot fluoreszenzgefärbt.

Die Folgen einer vorzeitigen Aktivierung der Granulozyten im Blut der Tiere während einer Listerieninfektion wurde *in vivo* näher charakterisiert. Hierzu wurden C57BL/6 Tiere mit der sublethalen Dosis von  $10^4$  CFU Listerien infiziert und mit unterschiedlichen Kombinationen aus Priming und Aktivierungssubstanzen intravenös behandelt. Die Überlebenskurve der behandelten Tiere wurde in Bezug zur infizierten Kontrollbehandlung mit PBS gesetzt. Die Priming- und Aktivierungssubstanzen haben *per se* ohne Infektion keinen Einfluss auf das Überleben der Tiere. Die Behandlung und somit die Voraktivierung mit GM-CSF und fMLP führte zu 100%iger Mortalität, wohingegen die unbehandelten Tiere zu knapp 80% überlebten (Abbildung 4.29.).

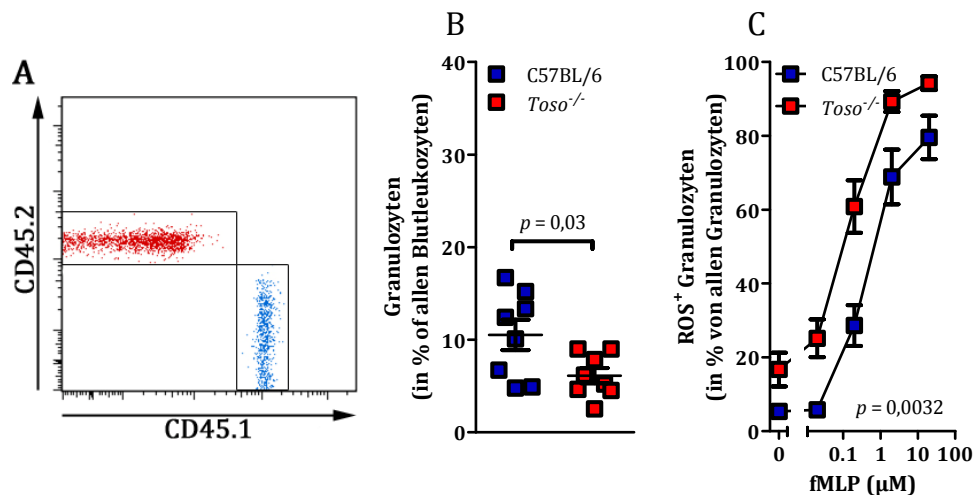


**Abbildung 4.29. Überlebenskurve einer Listerieninfektion bei Voraktivierung der Granulozyten.**

C57BL/6 Mäuse wurden mit  $10^4$  CFU *L. monocytogenes* (Listerien) infiziert. Eine Kontrollgruppe wurde mit PBS behandelt (schwarz ■), eine weitere wurde an den Tagen 1, 2 und 3 p.i. intravenös mit jeweils 120 ng GM-CSF (grau ▒) bzw. 120 ng GM-CSF und 100 ng fMLP (weiß □) substituiert. Die Substanzkontrolle erfolgte in der Tiergruppe ohne Infektion, welche mit 120 ng GM-CSF und 100 ng fMLP (weiß □) behandelt wurde. Das Überleben der Tiere wurde unter der Berücksichtigung von Abbruchkriterien (Belastung und Gewichtsverlust der Tiere) verfolgt. Die Signifikanz wurde bezogen auf die mit Listerien infizierte Kontrollgruppe.

## 4.9. Intrinsischer Defekt Toso defizienter Granulozyten

Die Voraktivierung Toso defizienter Granulozyten kann von verschiedenen humoralen Faktoren wie den proinflammatorischen Zytokinen, den Antikörpern sowie dem Komplementsystem jedoch auch von anderen Zellen wie B- und T-Zellen, Endothelzellen und Thrombozyten beeinflusst werden (Witko-Sarsat et al., 2000). Die bereits vorgestellten Daten konnten zeigen, dass Toso den Schwellenwert für die ROS Synthese beeinflusst und eine Voraktivierung der Granulozyten verhindert. Zur Untersuchung einer intrinsischen oder extrinsischen Ursache wurden zunächst Knochenmarkschimären generiert. C57BL/6 Mäuse wurden mit 1050 rad bestrahlt, um das Knochenmark und somit alle Immunzellen zu zerstören. Anschließend wurden die bestrahlten Mäuse mit einem 1:1 Knochenmarkgemisch aus C57BL/6 und *Toso*<sup>-/-</sup> Mäusen rekonstruiert. Zur Unterscheidung des Genotyps wurde das CD45 Allelsystem verwendet. Die Knochenmarkszellen aus Toso defizienten Tieren wiesen die Allelform CD45.2 auf, während die wildtypischen Knochenmarkszellen das Allel CD45.1 besaßen (Abbildung 4.30.A).



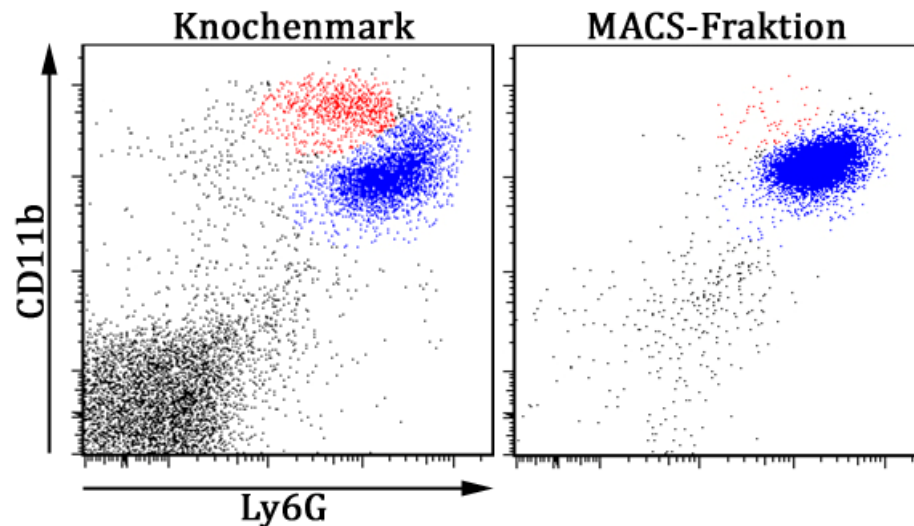
**Abbildung 4.30. Untersuchung der Granulozyten in gemischten Knochenmarkchimären.** C57BL/6 Empfängermaße wurden mit 1050 rad bestrahlt und Folgetag mit einem 1:1 Gemisch aus C57BL/6 (CD45.1; blau) und *Toso*<sup>-/-</sup> (CD45.2; rot) Knochenmarkzellen rekonstruiert. 30 Tage nach der Rekonstruktion wurden die Blutgranulozyten analysiert. A) Repräsentativer DotPlot der durchflusszytometrischen Analyse der Rekonstruktion vorselektiert auf Granulozyten. In Rot sind die *Toso* defizienten, in Blau die wildtypischen Zellen dargestellt B) Prozentualer Anteil der Blutgranulozyten aller Leukozyten. Die horizontale Linie gibt den Mittelwert der Gruppe an (n=8). C) Das periphere Blut wurde mit ansteigenden Konzentrationen an fMLP *in vitro* inkubiert. Die Frequenz der ROS der Granulozyten wurde in Prozent aller Granulozyten des entsprechenden Genotyps angegeben (n=8).

In den gemischten Knochenmarkchimären setzte sich die Granulozytenpopulation aus einem leicht höheren Anteil von C57BL/6 Zellen zusammen (Abbildung 4.30.B). Die Induktion der ROS-Synthese im peripheren Blut wurde anschließend an die Rekonstitution durchflusszytometrisch analysiert. Hierzu wurde das Blut mit ansteigenden Konzentrationen von fMLP *in vitro* inkubiert und der prozentuale Anteil ROS produzierender Granulozyten des jeweiligen Genotyps erfasst. Der prozentuale Anteil *Toso* defizienter Granulozyten, welche ROS produzierten, konnte bei allen getesteten fMLP Konzentration verglichen mit den C57BL/6 höher detektiert werden (Abbildung 4.30.C).

#### 4.10. Adoptivtransfer von C57BL/6 Granulozyten verbessert die Listerienkontrolle während der Infektion

Die Pathogenkontrolle und das Überleben der Tiere bei einer Listerieninfektion hängt von der effizienten Effektorfunktion der Granulozyten ab. Zur Ermittlung der Funktionalität der Granulozyten wurden adoptive Zelltransferexperimente durchgeführt. Hierzu wurden die Granulozyten des Knochenmarks unter der Verwendung von Ly6G positiv mittels

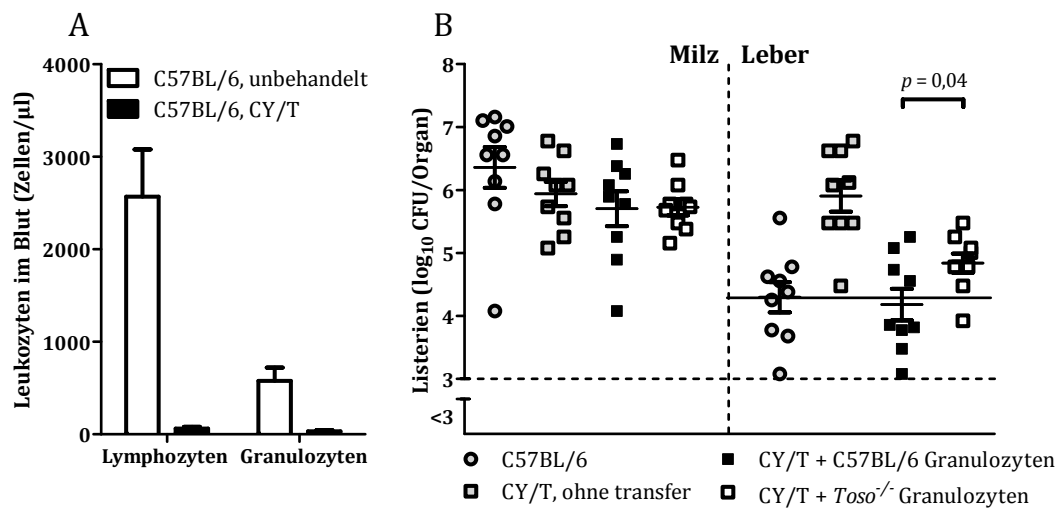
MACS-Methode aufgereinigt und nur Zellfraktionen mit einer Reinheit von >95% Granulozyten und einer maximalen Kontamination mit Monozyten von <0,1% weiter verwendet (Abbildung 4.31.).



**Abbildung 4.31. Aufreinigung von Granulozyten aus dem Knochenmark.** Granulozyten aus dem Knochenmark der Tiere wurden mittels Ly6G MACS-Kits (Miltenyi Biotec) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt und die Fraktionsreinheit in der Durchflusszytometrie analysiert. Der linke DotPlot zeigt das Knochenmark vor, der rechte nach der Aufreinigung. Die Fluoreszenzfärbung beider Fraktionen erfolgte unter Verwendung der Antikörpern Ly6G und CD11b und war stets über 95%. In Rot sind die Monozyten (Ly6G<sup>med</sup>, CD11b<sup>hi</sup>) und in Blau die Granulozyten (Ly6G<sup>hi</sup>, CD11b<sup>med</sup>) dargestellt.

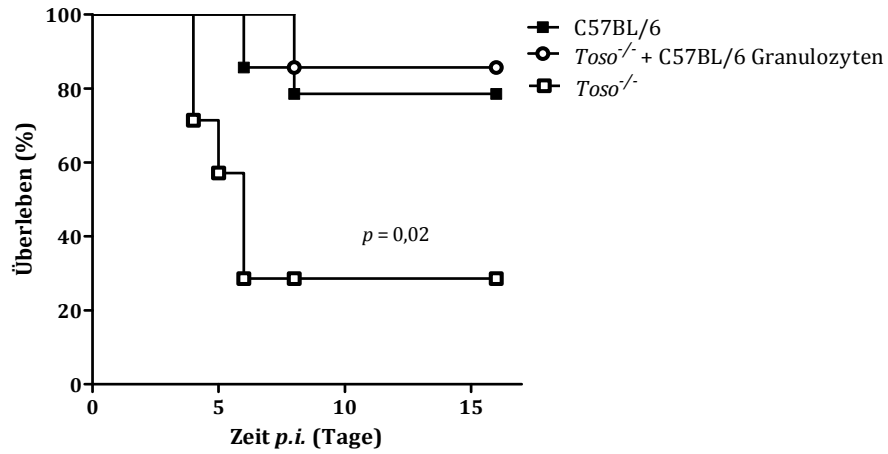
Zur Eliminierung der endogenen Granulozyten wurden zunächst C57BL/6 Mäuse mit Cyclophosphamid und Temozolomid (CY/T) vorbehandelt, wodurch drei Tage nach der Behandlung nahezu alle Lymphozyten und Granulozyten zerstört wurden (Abbildung 4.32.A). Anschließend wurden die CY/T vorbehandelten C57BL/6 Empfängertiere mit  $10^4$  CFU Listerien infiziert und an den Tagen null und eins der Infektion aufgereinigte Granulozyten aus dem Knochenmark von *Toso*<sup>-/-</sup> sowie C57BL/6 Mäusen adoptiv transferiert. Die Listerientiter wurden in der Milz und der Leber am zweiten Tag der Infektion bestimmt. Zur Kontrolle für den Transfer dienten Listerien infizierte CY/T vorbehandelte C57BL/6 Mäuse ohne Transfer von Granulozyten sowie eine weitere Gruppe infizierter C57BL/6 Mäuse ohne vorheriger CY/T Behandlung. Während in der Milz keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen detektiert werden konnten, zeigte der Adoptivtransfer in der Leber deutliche Unterschiede (Abbildung 4.32.B). Der Listerientiter zwischen unbehandelten und mit CY/T behandelten Mäusen war annähernd hundertfach höher und konnte durch den Transfer von C57BL/6 Granulozyten auf das Niveau der unbehandelten Tiere reduziert werden. Der Transfer *Toso* defizienter Granulozyten konnte dagegen eine schwächere Pathogenkontrolle erzielen, so dass fast

zehnfach höhere Titer als beim Transfer von C57BL/6 Granulozyten detektiert werden konnten (Abbildung 4.32.B).



**Abbildung 4.32. Listerientiter nach adoptivem Transfer von Granulozyten.** C57BL/6 Mäuse wurden zur Depletion von Leukozyten Cyclophosphamid (200 mg/kg Körpergewicht) und Temozolomid (90 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal appliziert. A) Am Tag drei nach CY/T-Behandlung (schwarze Balken) wurde den Tieren Blut entnommen und die Anzahl von Lymphozyten und Granulozyten in der Durchflusszytometrie mit unbehandelten C57BL/6 Mäusen (weiße Balken) verglichen ( $n=4$ ). B) Drei Tage nach CY/T-Behandlung wurden alle Tiere mit  $10^4$  CFU *L. monocytogenes* infiziert. Am Tag 3 und 4 nach der Behandlung wurden einer Gruppe jeweils  $8 \times 10^6$  C57BL/6 bzw. einer anderen Gruppe  $8 \times 10^6$  *Toso*<sup>-/-</sup> Granulozyten transferiert. Zur Kontrolle blieb eine CY/T-behandelte Gruppe ohne Transfer und eine weitere Gruppe von C57BL/6 wurde nur infiziert ohne mit CY/T behandelt worden zu sein. Am Tag 5 wurden die Milz und Leber der Tiere entnommen und die Listerientiter der Organe bestimmt. Jeder Datenpunkt stellt das Ergebnis eines individuellen Tieres dar und die horizontalen Linien zeigen den Mittelwert der Gruppe. Das Experiment wurde in drei unabhängigen Ansätzen mit jeweils drei Tieren pro Gruppe durchgeführt ( $n=9$ ).

Die Schlüsselfunktion der Granulozyten für das verminderte Überleben der Tiere bei *Toso* Defizienz während einer Infektion mit Listerien wurde ebenfalls mittels Adoptivtransfers von C57BL/6 Granulozyten untersucht. Hierzu wurden *Toso* defizienten Tieren an den Tagen null bis drei nach Infektion mit  $3 \times 10^3$  CFU Listerien aus dem Knochenmark aufgereinigte C57BL/6 Granulozyten transferiert und das Überleben der Tiere verfolgt. Der adoptive Transfer in *Toso*<sup>-/-</sup> Mäuse erhöhte die Überlebensrate auf ein mit C57BL/6 vergleichbares Niveau, wohingegen nahezu alle *Toso*<sup>-/-</sup> Mäuse ohne Transfer verstarben (Abbildung 4.33).



**Abbildung 4.33. Überlebenskurve der *Tosoz<sup>-/-</sup>* Mäuse nach adoptiven Granulozytentransfer während der Infektion mit *L. monocytogenes*.** C57BL/6 und *Tosoz<sup>-/-</sup>* Mäuse wurden mit  $3 \times 10^3$  CFU *L. monocytogenes* intravenös infiziert. Einer Gruppe *Toso* defizienter Mäuse wurde an Tag 0,1,2,3 p.i. intravenös jeweils  $8 \times 10^6$  C57BL/6 Granulozyten transferiert. Die übrigen Gruppen blieben unbehandelt. Das Überleben wurde unter der Berücksichtigung von Abbruchkriterien (Belastung und Gewichtsverlust der Tiere) beobachtet (n=7-14 Tiere pro Gruppe).

## 5. DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von Toso im Mausmodell während einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* untersucht. Nach der initialen Phagozytose der Bakterien durch gewebeständige Makrophagen migrieren die Granulozyten angelockt durch proinflammatorische Zytokine als erste Leukozytenpopulation zum Infektionsort. Die Granulozyten phagozytieren die opsonierten Pathogene und eliminieren diese durch die intrazelluläre Synthese von *reactive oxygen species* (ROS). Der Einfluss von Toso auf diese Prozesse wurde mit einer totalen Deletionsmutante analysiert.

Die Deletion von Toso konnte in der Maus sowohl auf DNA-, RNA- sowie auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abbildung 4.1. und Abbildung 4.6.). Toso defiziente Mäuse waren fertil und zeigten naiv keine gesundheitseinschränkende phänotypische Auffälligkeiten. Die Analyse der Zusammensetzung des Blutes hinsichtlich der Immunzellen zeigte eine über 50%ige Reduktion an B-Zellen, was sich jedoch nicht auf die Konzentration an löslichem IgM im Blut auswirkte (Abbildung 4.2. und Abbildung 4.9.A). Der Einfluss von Toso auf das Immunsystem wurde mit dem gram-positiven Bakterium *Listeria monocytogenes* näher untersucht. In diesem Untersuchungsmodell spielen die B-Lymphozyten eine untergeordnete Rolle (Mackness, 1962), so dass deren verminderte Frequenzen in Toso defizienten Mäusen keinen entscheidenden Einfluss auf den Ausgang der Infektion ausüben sollten.

### 5.1. Funktion von Toso auf die initiale Kontrolle der Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Die bakterielle Pathogenkontrolle benötigt ein effizientes Zusammenspiel der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Die ersten Anzeichen der adaptiven Immunantwort durch klonale Expansion von Listerien spezifischen T-Zellen lassen sich frühestens vier Tage nach der Infektion im Blut nachweisen (Busch et al., 1998). Die Mortalität tritt bei Toso defizienten Mäusen jedoch in den ersten drei Tagen nach der Infektion ein (Abbildung 4.3.), weswegen eine Dysfunktion des angeborenen Immunsystems vorzuliegen scheint. Im Zusammenhang mit der hohen Mortalität bei Toso

Defizienz sind die bakteriellen Titer in der Milz, Leber und im Gehirn stark erhöht (Abbildung 4.4.) und deuteten auf eine verminderte bakterielle Kontrolle hin.

Die initiale Eindämmung der Ausbreitung von Pathogenen zu Beginn einer Infektion wird durch gewebeständige Makrophagen in der Milz und der Leber gewährleistet (Conlan, 1996). Diese sind fest mit dem Endothel assoziiert, reichen ins Lumen der Blutgefäße hinein und sind aufgrund ihrer Lokalisation prädestiniert für die Filtration des Blutes von Pathogenen (Crispe, 2009; Lang et al., 2010). Durch spezifische Zelldepletion, unter der Verwendung einer intravenösen Applikation von in Liposomen eingeschlossenem Clodronat, kann der Einfluss gewebeständiger Makrophagen deutlich gemacht werden (van Rooijen et al., 1997). Bei einer systemischen Infektion mit dem lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) führte Untersuchungen zufolge die Depletion gewebeständiger Makrophagen zu einer unkontrollierten viralen Replikation und der Ausbreitung viraler Partikel in andere Organe. Die Konsequenz war eine verminderte zytotoxische T-Zellantwort und die Persistenz des Virus (Lang et al., 2010). Des Weiteren konnte eine essentielle Funktion gewebeständiger metallophiler Makrophagen der Milz für die Aufnahme von Pathogenen und die Präsentation ihrer Antigene bei Untersuchungen mit dem vesikulären stomatitis Virus (VSV) gezeigt werden. Das Fehlen dieser Zellpopulation führte zu einer ineffektiven Aktivierung des adaptiven Immunsystems und zu einer erhöhten Mortalität der Tiere (Honke et al., 2012).

Diese Beispiele verdeutlichen einen bedeutenden Einfluss gewebeständiger Makrophagen bei einer viralen Infektion. Der Einfluss dieser Zellpopulation bei einer bakteriellen Infektion wurde durch die spezifische Depletion mit Clodronat untersucht. Durch das Fehlen gewebeständiger Makrophagen erreichte die Mortalität in C57BL/6 Mäusen selbst bei einer Infektion mit einer nicht letalen Dosis von  $3 \times 10^2$  CFU Listerien eine Frequenz von 100% (Anhang 6.1.). Diese Bedeutung der Zellen für den Verlauf einer bakteriellen Infektion setzte zunächst die Untersuchung der Funktionalität von Makrophagen in *Toso* defizienten Mäusen voraus. Die nähere Charakterisierung dieser Zellpopulation erfolgte zum Ausschluss exogener Einflüsse ausschließlich *in vitro*. *Toso*<sup>-/-</sup> Makrophagen zeigten bei konfokaler Betrachtung hinsichtlich der Kapazität des Phagozytoseprozesses von Listerien eine mit wildtypischen Makrophagen vergleichbare Phagozytose (Abbildung 4.12.). Eine vergleichbare Funktionalität von Makrophagen beider Genotypen konnte zudem mittels eines Listerien-Eliminierungsassays bestimmt werden (Abbildung 4.13.). Insgesamt phagozytierten und eliminierten die Makrophagen beider Genotypen die Bakterien in einem vergleichbaren Ausmaß.



Neben gewebeständigen Makrophagen nehmen die neutrophilen Granulozyten einen gewichtigen Einfluss auf die anfängliche Kontrolle der Bakterienverbreitung. Diese Zellen migrieren innerhalb weniger Stunden zum Infektionsort und eliminieren die Pathogene ähnlich zu Makrophagen durch Phagozytose und intrazelluläre Synthese von ROS. Die Bedeutung bei einer bakteriellen Infektion wurde zahlreich beschrieben (Czuprynski et al., 1994; Rogers and Unanue, 1993) und konnte durch die spezifische Depletion der Granulozyten, die die Suszeptibilität in C57BL/6 Mäusen erhöhte, bestätigt werden (Abbildung 4.5.). Der adaptive Transfer von C57BL/6 Granulozyten in Toso defiziente Mäuse konnte dagegen die Resistenz für *L. monocytogenes* wiederherstellen (Abbildung 4.33.) und lässt auf Defizite bei Granulozyten in Abwesenheit von Toso schließen. Die genauere Untersuchung der Granulozyten wurde folglich *in vivo* und *in vitro* durchgeführt.

## 5.2. Einflüsse von Toso auf die Quantität der Granulozyten

Die Granulozyten reifen im Knochenmark aus, emigrieren ins Blut und wandern bei einer Inflammation zur Bekämpfung der Pathogene am Entzündungsort in das umliegende Gewebe. Im peripheren Blut haben die Granulozyten eine Lebenszeitspanne von einigen Stunden bevor sie durch spontane Apoptose sterben. Toso wurde ursprünglich als anti-apoptotisch wirkendes Molekül auf T-Zellen beschrieben (Hitoshi et al., 1998). Die Einflussnahme des Proteins auf die Steuerung der Apoptose und die Neubildung von Granulozyten wurde in diesem Zusammenhang untersucht.

Das Überleben der Granulozyten kann durch Pathogenkontakt, bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) sowie proinflammatorische Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren wie GM-CSF um einige Tage verlängert werden (Colotta et al., 1992; Hachiya et al., 1995; Kobayashi et al., 2005; Yamamoto et al., 1993). Zudem weisen apoptotische Granulozyten eine Herunterregulation von an der Phagozytose beteiligten Rezeptoren und folglich eine niedrigere Phagozytosekapazität auf, die ursächlich für die verminderte Effektorfunktion von Toso defizienten Granulozyten sein könnte (Whyte et al., 1993). Eine Störung der spontanen Apoptose sowie der überlebensverlängerende Einfluss von GM-CSF wurden *in vitro* untersucht und eine Involvierung von Toso auf diese Prozesse ausgeschlossen (Abbildung 4.7.A.).

Störungen, die die Neubildung der Granulozyten im Knochenmark betreffen, sind durch eine Neutropenie gekennzeichnet und mit chronischen und rezidivierenden bakteriellen Erkrankungen verbunden. Diese schwerwiegenden Krankheiten sind z.B. mit genetischen

Mutationen in den Genen ELA2 (Elastase 2), GFI1 (*growth factor-independent 1*) oder dem Kostmann-Syndrom assoziiert (Ancliff et al., 2001; Kostmann, 1956; Person et al., 2003). Die Neubildung der Granulozyten und deren Migration aus dem Knochenmark ins Blut wurden jedoch nicht durch die Defizienz von Toso beeinflusst (Abbildung 4.7.B). Korrelierend hierzu war die Populationsgröße reifer Granulozyten im peripheren Blut naiver *Toso*<sup>-/-</sup> Mäuse mit dem Blut von C57BL/6 Mäusen vergleichbar (Abbildung 4.2.A). Eine funktionelle Relevanz von Toso auf die Quantität oder Neubildung der Zellen konnte somit ausgeschlossen werden und nicht als Ursache für die erhöhte Mortalität herangezogen werden. Neben der Anzahl der Granulozyten ist auch deren funktionelle Qualität in Form von Phagozytose und Synthese von ROS entscheidend für den Ausgang einer Infektion mit Bakterien.

### 5.3. Komplement- und IgM-abhängige Phagozytose

Die opsonierten Pathogene werden durch Rezeptoren auf der Oberfläche von Granulozyten erkannt und phagozytiert (Medzhitov, 2001; Medzhitov and Janeway, 2000). In zwei unabhängigen Studien mit transfizierten HeLa-Zellen konnte eine direkte Bindung von IgM an Toso nachgewiesen werden (Shima et al., 2010; Vire et al., 2011). Diese führte innerhalb weniger Minuten zur Internalisierung des Toso/IgM Komplexes sowie zur lysosomalen Degradierung der Proteinkonglomerate (Vire et al., 2011). Dies stellt einen möglichen Mechanismus dar, wodurch an IgM Immunkomplexen gebundene Pathogene zur Eliminierung ins Zellinnere transportiert werden könnten und anschließend PAMPs intrazellulär zur Verfügung gestellt werden. Toso befindet sich sowohl im Menschen als auch in der Maus in der unmittelbaren Nachbarschaft zweier bereits beschriebener Fc-Rezeptoren pIgR und Fc $\alpha$ / $\mu$ R für IgM auf dem Chromosom 1 (Abbildung 5.1.). Diese weisen verglichen mit Toso einige konservierte Strukturen in der variablen Immunoglobindomäne (IgV) auf (Shima et al., 2010), binden jedoch nicht nur IgM, sondern auch IgA Polymere (Hamburger et al., 2004).

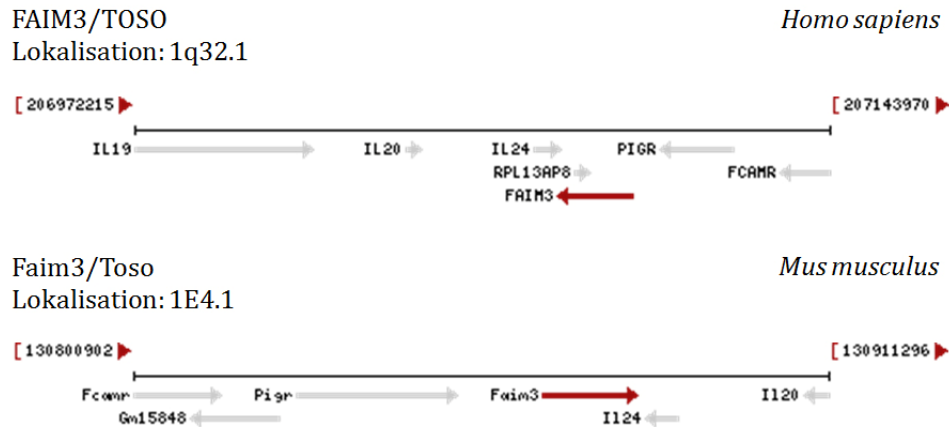


Abbildung 5.1.: *In silico* Analyse des Toso Genlokus auf Chromosom 1. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Chromosoms 1 des Menschen *Homo sapiens* (oben) und der Hausmaus *Mus musculus* (unten). Quelle <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Datum der Recherche 15.08.2012.

Die Charakterisierung von Toso als Rezeptor für IgM machte eine nähere Untersuchung des Phagozytoseprozesses notwendig. Toso defiziente Granulozyten zeigten verglichen mit C57BL/6 Granulozyten eine verminderte Phagozytoserate. Die Ursache hierfür wurde gesondert für das Komplementsystem und anti-Listerien-IgM Antikörper untersucht. In diesem Prozess kommt dem Komplementsystem eine größere Bedeutung zu (Abbildung 4.9.D). Die Hitzeinaktivierung der Komponenten verminderte die Phagozytose auf ein zwischen *Toso*<sup>-/-</sup> und C57BL/6 Granulozyten vergleichbar geringes Niveau (Abbildung 4.9.D). Die Verwendung vom intakten Serum einschließlich anti-Listerien-IgM Antikörper resultierte bei Anwesenheit von Toso in verbesserter Phagozytose opsonierter Listerien (Abbildung 4.9.C). Eine direkte Bindung der kommerziell erwerblichen murinen anti Listerien IgM-Pentamere an Pathogene im serumfreien Medium erbrachte jedoch eine mit C57BL/6 Granulozyten vergleichbarere Phagozytose von *Toso*<sup>-/-</sup> Zellen (Anhang 6.2).

Die gezeigten Versuche suggerieren eine auf den Phagozytoseprozess förderliche Wirkung der Interaktion von Toso mit löslichem IgM nur in Anwesenheit von Bestandteilen des Komplementsystems. Das Fehlen von nur einer dieser drei Komponenten führte zu keiner Potenzierung der Phagozytoserate von Pathogenen (Abbildung 4.9. und Anhang 6.2.). Eine mögliche Erklärung für den Zusammenhang könnte sein, dass Bestandteile des Komplementsystems zusammen mit IgM Immunkomplexen förderlich auf die C3 Opsonierung von Bakterien wirken und dessen anschließender Phagozytose über die Komplementrezeptoren 1 (C1R) und 3 (C3R) erlauben (Ogden et al., 2005; Schwartz et al., 2012). In einer Studie mit dem gram-negativen Bakterium *Francisella tularensis* konnte gezeigt werden, dass natürliches IgM im Serum von nicht immunen Menschen essentiell für die Komplement-abhängige Phagozytose ist. Das natürliche IgM bindet an die

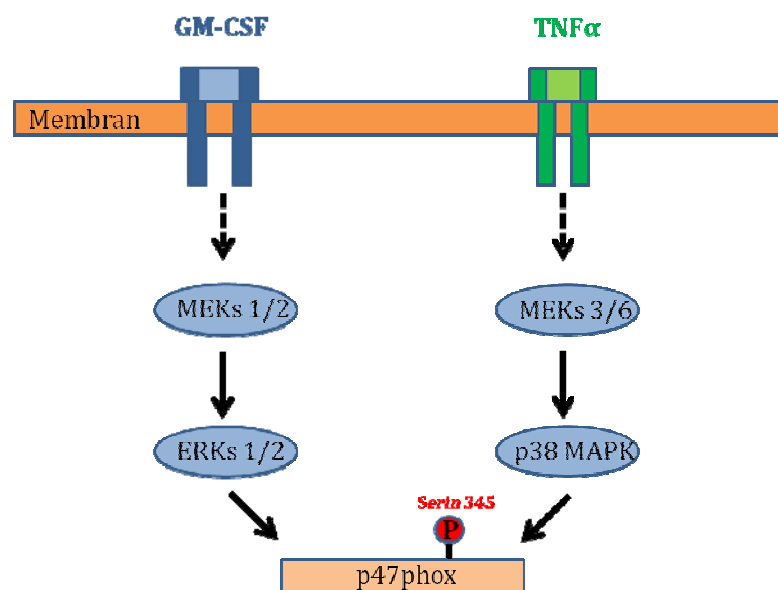
Oberfläche der Bakterien und aktiviert dadurch über C1q den klassischen Weg des Komplementsystems. Dies erhöht die C3 Anlagerung auf der Bakterienoberfläche und führt schließlich zur Phagozytose über den Komplementrezeptor 3 (Schwartz et al., 2012). Übertragen auf die Ergebnisse der durchgeführten Opsonierungsexperimente lässt die Studie von Schwartz et al. (2012) eine Involvierung von Toso bei diesem Vorgang möglich erscheinen. Toso könnte hierbei die Phagozytose opsonierter Pathogene durch direkte oder indirekte Interaktion mit den Komplementrezeptoren beeinflussen.

Die Bedeutung von IgM auf den Phagozytosevorgang konnte zusätzlich durch die *sIgM*<sup>-/-</sup> Maus verdeutlicht werden. Die Blutgranulozyten aus der *sIgM*<sup>-/-</sup> Maus zeigten ähnlich zu *Toso*<sup>-/-</sup> Granulozyten verglichen mit C57BL/6 Zellen eine verminderte Phagozytoserate (Abbildung 4.8.). Eine exogene Ursache für die Minderung der Aufnahmekapazität Toso defizienter Granulozyten durch z. B. geringere Konzentrationen humoraler Faktoren im Serum der Tiere konnte ausgeschlossen werden (Abbildung 4.9.A und Abbildung 6.3.). Die Hypothese eines intrinsischen Defekts der Granulozyten bei Toso Defizienz wurde durch adaptiven Zelltransfer *Toso*<sup>-/-</sup> sowie C57BL/6 Granulozyten in CY/T behandelte C57BL/6 Empfängertiere bekräftigt. In diesem Experiment zeigten die C57BL/6 Granulozyten verglichen mit *Toso*<sup>-/-</sup> Granulozyten *in vivo* eine verbesserte bakterielle Kontrolle (Abbildung 4.32.B).

#### 5.4. Involvierung von Toso bei der ROS-Synthese

Die bakterielle Phagozytose durch Granulozyten ruft die intrazelluläre Synthese von ROS hervor. Die enge Verknüpfung beider Prozesse zeigte sich durch die Analyse der ROS-Produktion phagozytischer Granulozyten gegenüber Granulozyten ohne Aufnahme von Listerien (Abbildung 4.16.). Sauerstoffradikale konnten nur in Granulozyten detektiert werden, welche Bakterien aufgenommen hatten (Abbildung 4.16.). Der Einfluss von Toso auf die Reduktion des Sauerstoffs zu O<sup>•</sup> wurde *in vitro* genauer untersucht. Die Induktion der ROS-Synthese ist in zwei Phasen, die Priming- und die Aktivierungsphase, gegliedert. Die Synthese von ROS benötigt zwingend die Assemblierung der Untereinheiten der NADPH-Oxidase (Segal, 2005). Die NADPH-Oxidase ist ein Multiproteinkomplex, welcher aus sechs Proteinen besteht von denen zwei das in der Membran eingebaute Flavocytochrom b<sub>558</sub> bilden und die anderen von zytosolischen Proteinen gestellt werden (Babior, 1999). Die Verteilung dieser Proteine im Zytosol nicht aktivierter Zellen soll einen inaktivierten Zustand der NADPH-Oxidase gewährleisten, welcher erst bei Stimulation zur

Assemblierung der zytosolischen Komponenten mit dem Flavocytochrom  $b_{558}$  führt (Groemping and Rittinger, 2005). Defekte in einer der Untereinheiten der NADPH-Oxidase verursachen die sehr heterogene Erkrankungsgruppe der chronischen Granulomatose (*chronic granulomatous disease*; CGD) zu der über 410 verschiedene Störungen zählen, welche durch verringerte ROS-Synthese gekennzeichnet sind (Heyworth et al., 2003). CGD-Patienten sind suszeptibel gegenüber bakteriellen und Pilzinfektionen (Baehner and Nathan, 1967; Winkelstein et al., 2000). Die Assemblierung der funktionfähigen NADPH-Oxidase wird durch Phosphorylierung der zytosolischen Komponenten erzielt. Potente Primingsubstanzen wie GM-CSF und  $TNF\alpha$  führen über verschiedene Signalmoleküle zu der Phosphorylierung der wichtigsten zytosolischen Untereinheit p47phox (Dewas et al., 2003; Faust et al., 1995). GM-CSF führt hierbei zur Phosphorylierung des Serins  $S_{345}$  über den ERK1/2 MAPK-Weg, während  $TNF\alpha$  das gleiche Serin über den p38 MAPK-Weg phosphorylieren lässt (El-Benna et al., 2008) (Abbildung 5.2). Die Phosphorylierung von p47phox führt schließlich zu einer Konformationsänderung der Untereinheit, welche die Assemblierung zum aktiven Enzym ermöglicht (Park and Babior, 1997).



**Abbildung 5.2.: Phosphorylierung von p47phox über verschiedene MAP Kinase-Wege.** In Granulozyten induziert GM-CSF die Phosphorylierung von p47phox am Serin  $S_{345}$  über ERK1/2, während  $TNF\alpha$  dies über p38 durchführt. Abbildung verändert aus (El-Benna et al., 2008).

Erwartungsgemäß produzierten die Granulozyten von C57BL/6 Mäusen auch bei hohen Konzentrationen der Primingsubstanzen GM-CSF, LPS und  $TNF\alpha$  kaum ROS, während in *Toso*<sup>-/-</sup> Granulozyten spezifisch  $TNF\alpha$  eine signifikante ROS-Synthese induzieren konnte (Abbildung 4.17.C). Eine kürzlich erschienene Publikation brachte Toso in Zusammenhang

mit der Schwellenwertsetzung für die TNF $\alpha$  induzierte Apoptose und konnte mittels heterologer Expressionsstudien sowie *in vivo* Untersuchungen die anti-apoptotische Wirkung von Toso bestätigen (Nguyen et al., 2011). Die vorgestellten Daten passen zur erhöhten TNF $\alpha$  Sensitivität und verstärkten ROS-Synthese Toso defizienter Granulozyten. Die Induktion der ROS-Synthese war TNF $\alpha$  spezifisch und konnte nicht bei GM-CSF oder LPS beobachtet werden, weswegen eine Involvierung von Toso in den p38 Signalweg möglich zu sein scheint.

In diesem Zusammenhang konnte in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit ein auf den TNF $\alpha$  induzierten Primingeffekt regulatorisch wirkendes Protein charakterisiert werden (Boussetta et al., 2010). Das Priming mit TNF $\alpha$  aktiviert die Isomerase Pin1, welche an das phosphorylierte Serin S<sub>345</sub> von p47phox bindet und die Konformationsänderung sowie die Phosphorylierung weiterer Aminosäuren durch die Proteinkinase C (PKC) induziert. Dies ermöglicht schließlich die Bindung von p47phox an die p22phox-Untereinheit, was zur Assemblierung des funktionsfähigen NADPH-Oxidase Komplexes führt. Die Inhibierung von Pin1 konnte den Primingeffekt von TNF $\alpha$  aufheben. Diese Studien lassen vermuten, dass Toso entweder bei der Phosphorylierung von p47phox über Moleküle des p38 Signalwegs involviert sein könnte oder regulatorisch auf Pin1 einwirken könnte.

Die gemischten Knochenmarkchimären konnten zudem zeigen, dass eine intrinsische Dysfunktion der *Toso*<sup>-/-</sup> Granulozyten in Bezug auf die Induktion der ROS-Synthese vorliegen muss (Abbildung 4.30.). Bei allen getesteten Konzentrationen von fMLP reagierte in gemischten Chimären ein höherer Anteil an *Toso*<sup>-/-</sup> Granulozyten verglichen mit C57BL/6 Granulozyten mit der Synthese von ROS. Dieser Befund konnte mit Einzelknochenmarkchimären rekonstituiert mit Toso defizientem bzw. C57BL/6 Knochenmark verifiziert werden (Anhang 6.4.).

Insgesamt führte die Behandlung der Granulozyten aus allen Chimären mit ansteigenden Konzentrationen von fMLP im Vergleich zu Granulozyten aus naiven, unbestrahlten Mäusen zu erhöhter ROS-Synthese (Abbildung 4.18. und Abbildung 4.30). Untersuchungen zufolge konnten im Serum bestrahlter Tiere erhöhte Konzentrationen an Zytokinen, von denen einige Primingpotenzial haben, detektiert werden (Cairo et al., 1992; Lee et al., 2004).

## 5.5. Folgen der fehlgesteuerten ROS-Synthese

Die Abwesenheit von Toso in Granulozyten führte beim Priming und anschließender Aktivierung sowie bei direkter Aktivierung mit fMLP *in vitro* zu erhöhter ROS-Synthese (Abbildung 4.18. und Abbildung 4.19.). Toso könnte somit eine ungeeignete und vorzeitige Aktivierung der Granulozyten im Blut verhindern, so dass die ROS-Synthese erst bei Pathogenkontakt in Organen erfolgt. Die fehlgeleitete Induktion der Radikal-Synthese wird beim direkten Vergleich der ROS Produktion der Granulozyten im Blut und der Milz deutlich (Abbildung 4.21.A und Abbildung 4.22.). In wildtypischen Zellen verminderte die Expression von Toso die ROS-Synthese im Blut, verstärkte diese jedoch im Organ. Der zugrunde liegende funktionelle Mechanismus von Toso wird unter der Berücksichtigung der Expressionsanalyse deutlich. Die Phagozytose von Listerien verringerte die Oberflächenexpression von Toso deutlich (Abbildung 4.15. und Abbildung 4.16.). In diesem Kontext würde die Expression von Toso auf Blutgranulozyten bei Kontakt mit Primingsubstanzen wie TNF $\alpha$ , welche von Kupfferzellen relativ früh während der Infektion sezerniert werden, der Verhinderung der ROS-Induktion im Blut dienen (Havell, 1987). Nach der Migration in die Organe phagozytieren die Granulozyten die Listerien infolge dessen Toso internalisiert werden würde. Die Herunterregulation des Proteins würde die Sensitivität auf Primingsubstanzen in Organen verringern und die ROS-Synthese erlauben.

Die Konsequenz einer unkontrollierten und ineffizienten Aktivierung der Granulozyten im Blut konnte durch die Applikation der Tiere mit Priming- und Aktivierungssubstanzen während der Infektion induziert werden. Die Behandlung der C57BL/6 Tiere, die unbehandelt die Infektion mit Listerien überlebten, führte zur Suszeptibilität der Mäuse für die Pathogene (Abbildung 4.29.). Die Hyperaktivierung der Granulozyten ist zudem häufig mit Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel der Vaskulitis assoziiert (Cascao et al., 2009; Kain et al., 2010; Nathan, 2006). Studien mit bereits im Blut geprimten Granulozyten konnten diesen nachteiligen Effekt bestätigen. Eine mehrfache Kombinationsbehandlung mit LPS und fMLP führte in Kaninchen zur verstärkten Aktivierung von Granulozyten und daraus resultierenden Gewebeschädigung der Lungen (Worthen et al., 1987). Die *ex vivo* Stimulation von Granulozyten aus Lymphompatienten, die mit GM-CSF behandelt wurden, zeigte eine erhöhte Sensitivität der Granulozyten auf fMLP (Khwaja et al., 1992). Des Weiteren korrelierte die Intensität der ROS Produktion mit der Konzentration von TNF $\alpha$  im Blut von *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) Patienten und Pathogenese der Lungenverletzung (Chollet-Martin et al., 1992)

## 5.6. Einfluss des Integrins CD11b

Das Integrin CD11b (Mac1) ist ein Bestandteil des Komplement 3 Rezeptors (C3R) und wird als Marker für den Aktivierungszustand der Granulozyten genutzt. Die Expression von CD11b wird während der Primingphase durch die Verschmelzung von Granula mit der Plasmamembran heraufreguliert. Toso defiziente Granulozyten wiesen im Vergleich zu C57BL/6 Granulozyten eine erhöhte basale Expression der Integrine CD11b und CD18 auf, weshalb von einer Voraktivierung der Granulozyten im Blut ausgegangen werden konnte (Abbildung 4.24.). Das Priming mit GM-CSF oder LPS induzierte eine Hochregulation des Integrins auf C57BL/6 Granulozyten, so dass die geprimten C57BL/6 Granulozyten eine mit Toso defizienten Zellen vergleichbare Expression von CD11b aufwiesen (Abbildung 4.25.). Infolge eines aktivierenden Stimulus korrelierte das Priming von C57BL/6 Granulozyten durch GM-CSF oder LPS mit einem niedrigeren Schwellenwert für die Induktion der ROS-Synthese. Die ungeprimten Granulozyten produzierten beim Kontakt mit fMLP kaum ROS, wohingegen das Priming zur Synthese von ROS führte (Abbildung 4.18. und Abbildung 4.19.).

Die Korrelation des Aktivierungszustands von Granulozyten mit der ROS-Synthese wird beim Fehlen von CD11b deutlich. Die Deletion von CD11b in Toso defizienten Tieren führte *in vitro* zu einer verringerten ROS-Synthese, die vergleichbar mit der ROS-Produktion von C57BL/6 Granulozyten war (Abbildung 4.26.). Der verringerte Aktivierungszustand und die reduzierte ROS-Synthese verminderten *in vivo* die Mortalität von *Toso*<sup>-/-</sup> x *CD11b*<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber *Toso*<sup>-/-</sup> Tieren während der Infektion mit Listerien (Abbildung 4.27.).

Der direkte Nachweis einer Interaktion von Toso mit CD11b bzw. ein regulatorischer Zusammenhang beider Proteine auf die Assemblierung der NADPH-Oxidase konnte jedoch nicht erbracht werden. Ein Zusammenhang von ROS-Synthese und der Expression von CD11b wurde in Makrophagen durch eine Blockierung von CD11b mit einem spezifischen Antikörper verdeutlicht. Die Behandlung führte *in vitro* zur Störung der Assemblierung des NADPH-Oxidase Komplexes und folglich zur kompletten Inhibierung der ROS-Synthese in Makrophagen (Husemann et al., 2001).



## 5.7. Ausblick

Zusammenfassend lassen die Untersuchungen vermuten, dass Toso zwei Funktionen ausübt. Zum einen fungiert Toso als ein exklusiver Fc-Rezeptor für IgM und ist an der Phagozytose von IgM opsonierten Pathogenen beteiligt, zum anderen reguliert Toso Signale, die zum Priming und zur Aktivierung der Granulozyten beitragen. Die duale Funktion von Toso konnte bereits für andere Rezeptoren wie das Integrin CD11b nachgewiesen werden. CD11b bindet verschiedene Liganden wie ICAM-1, iC3b, Kollagen, Fibrinogen und ist somit an der Phagozytose von Komplement opsonierten Pathogenen beteiligt (Ross, 2002) sowie ein negativer Regulator von TLR-Signalen (Han et al., 2010; Means and Luster, 2010; Mocsai et al., 2006).

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass Toso den Schwellenwert für die Induktion der ROS-Synthese sowie die Phagozytose von IgM opsonierten Bakterien beeinflusst. Die molekularen Grundlagen für diese Funktionen konnten jedoch bisher nicht ermittelt werden. Es ist noch offen, ob Toso direkt oder indirekt mit anderen Rezeptoren wie z.B. CD11b auf der Oberfläche von Granulozyten sowie anderen Zellen interagiert oder in intrazelluläre Signalwege wie den p38 MAP-Kinaseweg eingreift. Die gezielte Betrachtung der Phosphorylierung von hierfür relevanten Proteinen sowie Interaktionsstudien mit anderen Proteinen könnten in diesem Kontext helfen, die Funktion von Toso genauer zu charakterisieren.

## 6. ANHANG

### 6.1. *In vivo* Depletion von Makrophagen

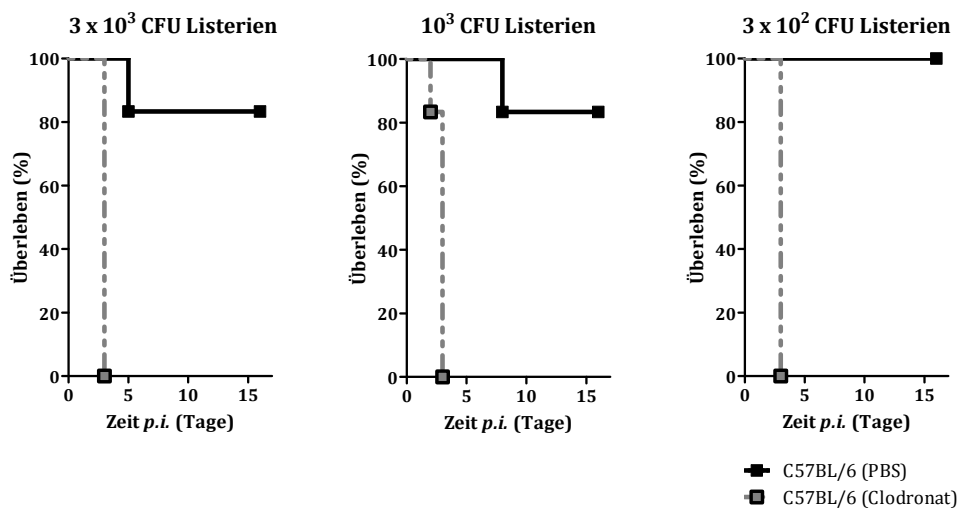
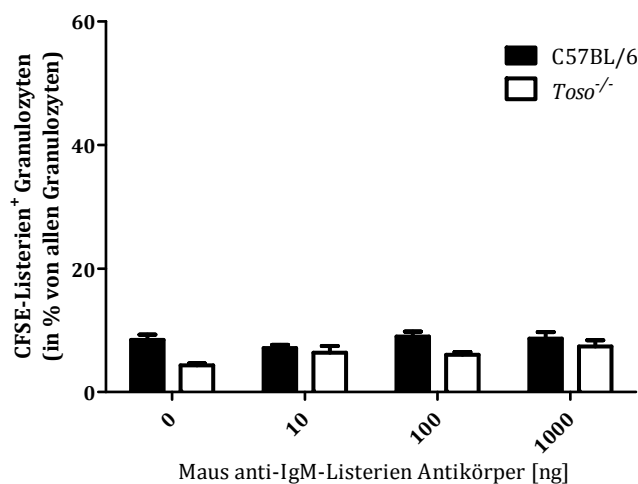


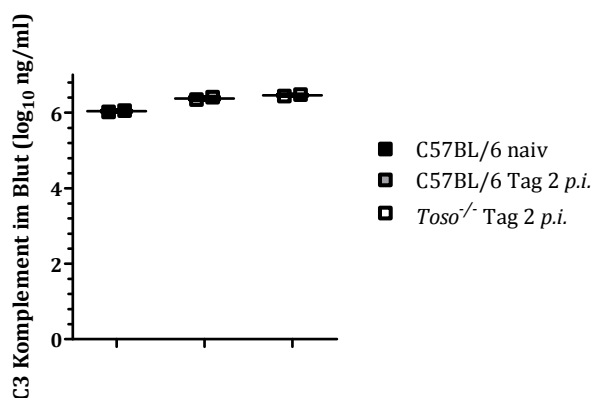
Abbildung 6.1.: Überlebenskurve von C57BL/6 Mäusen in Abhängigkeit von gewebeständigen Makrophagen bei einer Infektion mit *L. monocytogenes*. C57BL/6 Mäuse wurden intravenös mit 200  $\mu$ l Clodronat behandelt (n=6 grau) oder blieben unbehandelt (n=6 schwarz). Am Folgetag wurden die Mäuse mit  $3 \times 10^3$ ,  $10^3$  oder  $3 \times 10^2$  CFU *L. monocytogenes* intravenös infiziert und das Überleben unter der Berücksichtigung von Abbruchkriterien (wie Belastung und Gewichtsverlust der Tiere) beobachtet. Die Infektion der Versuchstiere wurde in zwei unabhängigen Versuchsansätzen durchgeführt

## 6.2. IgM abhängige Phagozytose im serumfreien Medium



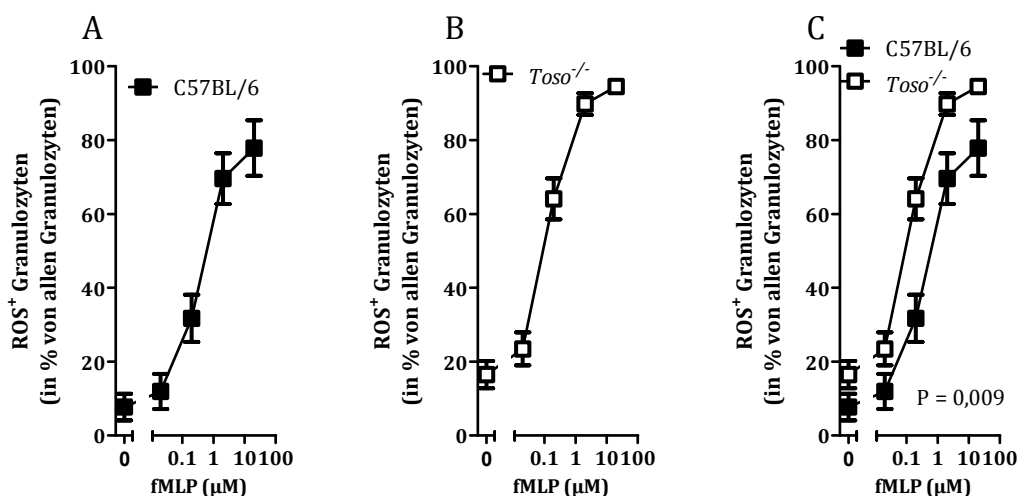
**Abbildung 6.2.: Phagozytose von CFSE Listerien in Abhängigkeit vom kommerziellen IgM.** Das Blut von C57BL/6 (schwarze Balken) und Toso<sup>-/-</sup> (weiße Balken) Mäusen wurde dreimal mit serumfreiem Medium zur Entfernung der humoralen Komponenten des Blutes gewaschen. 10<sup>6</sup> CFU CFSE-Listerien wurden mit den angegebenen Konzentration von anti-IgM-Listerien Antikörpern (Santa Cruz) für eine Stunde vorinkubiert. Anschließend wurde dies mit dem gewaschenen Blut für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die CFSE-Listerien<sup>+</sup> Granulozyten in Prozent von allen Granulozyten wurden in der Durchflusszytometrie bestimmt (n=4/Gruppe)

## 6.3. Konzentration von C3 im Serum



**Abbildung 6.3.: Konzentration von C3 im Serum.** C57BL/6 (grau) und Toso<sup>-/-</sup> (weiß) Mäuse wurden mit 10<sup>4</sup> CFU *L. monocytogenes* infiziert und das Blut an Tag 2 p.i. entnommen. Zur Kontrolle wurde Blut naiver C57BL/6 Tieren (schwarz) verwendet. Von diesem Blut wurde die Konzentration von C3 mittels ELISA quantifiziert.

## 6.4. ROS-Synthese in Einzelknochenmarkchimären



**Abbildung 6.4.: Untersuchung der Granulozyten in Einzelknochenmarkchimären.** C57BL/6 Empfängermause wurden mit 1050 rad bestrahlt und am folgenden Tag mit einem C57BL/6 (CD45.1; schwarz) oder *Toso*<sup>-/-</sup> (CD45.2; weiß) Knochenmarkzellen rekonstruiert. 30 Tage nach der Knochenmarksrekonstruktion wurden die Blutgranulozyten analysiert. Das periphere Blut von C57BL/6 (A) oder *Toso*<sup>-/-</sup> (B) wurde mit ansteigenden Konzentrationen von fMLP inkubiert. C) zeigt die Überlagerung der Ergebnisse aus A und B. Die Frequenz der ROS der Granulozyten wurde in Prozent aller Granulozyten des entsprechenden Genotyps angegeben (n=8).

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas, A.R., D. Baldwin, Y. Ma, W. Ouyang, A. Gurney, F. Martin, S. Fong, M. van Lookeren Campagne, P. Godowski, P.M. Williams, A.C. Chan, and H.F. Clark. 2005. Immune response in silico (IRIS): immune-specific genes identified from a compendium of microarray expression data. *Genes and immunity* 6:319-331.
- Akashi, K., T. Reya, D. Dalma-Weiszhausz, and I.L. Weissman. 2000a. Lymphoid precursors. *Current opinion in immunology* 12:144-150.
- Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto, and I.L. Weissman. 2000b. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404:193-197.
- Ancliff, P.J., R.E. Gale, R. Liesner, I.M. Hann, and D.C. Linch. 2001. Mutations in the ELA2 gene encoding neutrophil elastase are present in most patients with sporadic severe congenital neutropenia but only in some patients with the familial form of the disease. *Blood* 98:2645-2650.
- Anderson, K.E., K.B. Boyle, K. Davidson, T.A. Chessa, S. Kulkarni, G.E. Jarvis, A. Sindrilaru, K. Scharffetter-Kochanek, O. Rausch, L.R. Stephens, and P.T. Hawkins. 2008. CD18-dependent activation of the neutrophil NADPH oxidase during phagocytosis of *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* is regulated by class III but not class I or II PI3Ks. *Blood* 112:5202-5211.
- Antal, E.A., E.M. Loberg, E. Dietrichs, and J. Maehlen. 2005. Neuropathological findings in 9 cases of listeria monocytogenes brain stem encephalitis. *Brain Pathol* 15:187-191.
- Babior, B.M. 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood* 93:1464-1476.
- Baehner, R.L., and D.G. Nathan. 1967. Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease. *Science* 155:835-836.
- Bancroft, G.J., R.D. Schreiber, and E.R. Unanue. 1991. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunological reviews* 124:5-24.
- Berger, M., J. O'Shea, A.S. Cross, T.M. Folks, T.M. Chused, E.J. Brown, and M.M. Frank. 1984. Human neutrophils increase expression of C3bi as well as C3b receptors upon activation. *The Journal of clinical investigation* 74:1566-1571.
- Bhardwaj, V., O. Kanagawa, P.E. Swanson, and E.R. Unanue. 1998. Chronic Listeria infection in SCID mice: requirements for the carrier state and the dual role of T cells in transferring protection or suppression. *J Immunol* 160:376-384.
- Bianchi, M., A. Hakkim, V. Brinkmann, U. Siler, R.A. Seger, A. Zychlinsky, and J. Reichenbach. 2009. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* 114:2619-2622.
- Bielecki, J., P. Youngman, P. Connelly, and D.A. Portnoy. 1990. *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* 345:175-176.
- Borregaard, N., and J.B. Cowland. 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89:3503-3521.
- Borregaard, N., M. Sehested, B.S. Nielsen, H. Sengelov, and L. Kjeldsen. 1995. Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. *Blood* 85:812-817.
- Borregaard, N., and A.I. Tauber. 1984. Subcellular localization of the human neutrophil NADPH oxidase. b-Cytochrome and associated flavoprotein. *The Journal of biological chemistry* 259:47-52.
- Boussetta, T., M.A. Gougerot-Pocidallo, G. Hayem, S. Ciappelloni, H. Raad, R. Arabi Derkawi, O. Bournier, Y. Kroviarski, X.Z. Zhou, J.S. Malter, P.K. Lu, A. Bartegi, P.M. Dang, and J. El-Benna. 2010. The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for

- TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood* 116:5795-5802.
- Brach, M.A., S. deVos, H.J. Gruss, and F. Herrmann. 1992. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood* 80:2920-2924.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D.S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532-1535.
- Brinkmann, V., and A. Zychlinsky. 2007. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature reviews. Microbiology* 5:577-582.
- Busch, D.H., I.M. Pilip, S. Vijh, and E.G. Pamer. 1998. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* 8:353-362.
- Cairo, M.S., Y. Suen, L. Sender, E.R. Gillan, W. Ho, J.M. Plunkett, and C. van de Ven. 1992. Circulating granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) levels after allogeneic and autologous bone marrow transplantation: endogenous G-CSF production correlates with myeloid engraftment. *Blood* 79:1869-1873.
- Cantor, A.B., and S.H. Orkin. 2001. Hematopoietic development: a balancing act. *Current opinion in genetics & development* 11:513-519.
- Cascao, R., H.S. Rosario, and J.E. Fonseca. 2009. Neutrophils: warriors and commanders in immune mediated inflammatory diseases. *Acta reumatologica portuguesa* 34:313-326.
- Chertov, O., D. Yang, O.M. Howard, and J.J. Oppenheim. 2000. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunological reviews* 177:68-78.
- Chollet-Martin, S., P. Montravers, C. Gibert, C. Elbim, J.M. Desmonts, J.Y. Fagon, and M.A. Gougerot-Pocidaló. 1992. Subpopulation of hyperresponsive polymorphonuclear neutrophils in patients with adult respiratory distress syndrome. Role of cytokine production. *The American review of respiratory disease* 146:990-996.
- Clark, R.A., B.D. Volpp, K.G. Leidal, and W.M. Nauseef. 1990. Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *The Journal of clinical investigation* 85:714-721.
- Colotta, F., F. Re, N. Polentarutti, S. Sozzani, and A. Mantovani. 1992. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80:2012-2020.
- Conlan, J.W. 1996. Early pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection in the mouse spleen. *Journal of medical microbiology* 44:295-302.
- Cossart, P. 2007. Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 9:1143-1146.
- Crispe, I.N. 2009. The liver as a lymphoid organ. *Annual review of immunology* 27:147-163.
- Czuprynski, C.J., J.F. Brown, N. Maroushek, R.D. Wagner, and H. Steinberg. 1994. Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 152:1836-1846.
- Dang, P.M., C. Dewas, M. Gaudry, M. Fay, E. Pedruzzi, M.A. Gougerot-Pocidaló, and J. El Benna. 1999. Priming of human neutrophil respiratory burst by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) involves partial phosphorylation of p47(phox). *The Journal of biological chemistry* 274:20704-20708.
- DeLeo, F.R., J. Renee, S. McCormick, M. Nakamura, M. Apicella, J.P. Weiss, and W.M. Nauseef. 1998. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *The Journal of clinical investigation* 101:455-463.
- Deng, Y.J., Z.X. Huang, C.J. Zhou, J.W. Wang, Y. You, Z.Q. Song, M.M. Xiang, B.Y. Zhong, and F. Hao. 2006. Gene profiling involved in immature CD4+ T lymphocyte responsible for systemic lupus erythematosus. *Molecular immunology* 43:1497-1507.

- Dewas, C., P.M. Dang, M.A. Gougerot-Pocidaló, and J. El-Benna. 2003. TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 171:4392-4398.
- Dexter, T.M. 1990. Introduction to the haemopoietic system. *Cancer surveys* 9:1-5.
- Domann, E., J. Wehland, M. Rohde, S. Pistor, M. Hartl, W. Goebel, M. Leimeister-Wachter, M. Wuenscher, and T. Chakraborty. 1992. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *The EMBO journal* 11:1981-1990.
- Ehltling, C., N. Ronkina, O. Bohmer, U. Albrecht, K.A. Bode, K.S. Lang, A. Kotlyarov, D. Radzioch, M. Gaestel, D. Haussinger, and J.G. Bode. 2011. Distinct functions of the mitogen-activated protein kinase-activated protein (MAPKAP) kinases MK2 and MK3: MK2 mediates lipopolysaccharide-induced signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation by preventing negative regulatory effects of MK3. *The Journal of biological chemistry* 286:24113-24124.
- El-Benna, J., P.M. Dang, and M.A. Gougerot-Pocidaló. 2008. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Seminars in immunopathology* 30:279-289.
- Elbim, C., S. Bailly, S. Chollet-Martin, J. Hakim, and M.A. Gougerot-Pocidaló. 1994. Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides. *Infection and immunity* 62:2195-2201.
- Faurschou, M., and N. Borregaard. 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5:1317-1327.
- Faust, L.R., J. el Benna, B.M. Babior, and S.J. Chanock. 1995. The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *The Journal of clinical investigation* 96:1499-1505.
- Fuchs, T.A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* 176:231-241.
- Funkner, P. 2012. Der Einfluss von Toso in der Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Lymphozyten. *Dissertation*
- Furze, R.C., and S.M. Rankin. 2008. The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22:3111-3119.
- Gaillard, J.L., P. Berche, C. Frehel, E. Gouin, and P. Cossart. 1991. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 65:1127-1141.
- Gao, J.L., E.J. Lee, and P.M. Murphy. 1999. Impaired antibacterial host defense in mice lacking the N-formylpeptide receptor. *The Journal of experimental medicine* 189:657-662.
- Gellin, B.G., and C.V. Broome. 1989. Listeriosis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 261:1313-1320.
- Giebel, B., T. Zhang, J. Beckmann, J. Spanholtz, P. Wernet, A.D. Ho, and M. Punzel. 2006. Primitive human hematopoietic cells give rise to differentially specified daughter cells upon their initial cell division. *Blood* 107:2146-2152.
- Graves, V., T. Gabig, L. McCarthy, E.F. Strour, T. Leemhuis, and D. English. 1992. Simultaneous mobilization of Mac-1 (CD11b/CD18) and formyl peptide chemoattractant receptors in human neutrophils. *Blood* 80:776-787.
- Groemping, Y., and K. Rittinger. 2005. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *The Biochemical journal* 386:401-416.

- Guleria, I., and J.W. Pollard. 2001. Aberrant macrophage and neutrophil population dynamics and impaired Th1 response to *Listeria monocytogenes* in colony-stimulating factor 1-deficient mice. *Infection and immunity* 69:1795-1807.
- Hachiya, O., Y. Takeda, H. Miyata, H. Watanabe, T. Yamashita, and F. Sendo. 1995. Inhibition by bacterial lipopolysaccharide of spontaneous and TNF-alpha-induced human neutrophil apoptosis in vitro. *Microbiology and immunology* 39:715-723.
- Hakim, A., B.G. Furnrohr, K. Amann, B. Laube, U.A. Abed, V. Brinkmann, M. Herrmann, R.E. Voll, and A. Zychlinsky. 2010. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:9813-9818.
- Hamburger, A.E., A.P. West, Jr., and P.J. Bjorkman. 2004. Crystal structure of a polymeric immunoglobulin binding fragment of the human polymeric immunoglobulin receptor. *Structure* 12:1925-1935.
- Hamon, M., H. Bierne, and P. Cossart. 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nature reviews. Microbiology* 4:423-434.
- Hampton, M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn. 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92:3007-3017.
- Han, C., J. Jin, S. Xu, H. Liu, N. Li, and X. Cao. 2010. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nat Immunol* 11:734-742.
- Hartt, J.K., G. Barish, P.M. Murphy, and J.L. Gao. 1999. N-formylpeptides induce two distinct concentration optima for mouse neutrophil chemotaxis by differential interaction with two N-formylpeptide receptor (FPR) subtypes. Molecular characterization of FPR2, a second mouse neutrophil FPR. *The Journal of experimental medicine* 190:741-747.
- Havell, E.A. 1987. Production of tumor necrosis factor during murine listeriosis. *J Immunol* 139:4225-4231.
- Heyworth, P.G., A.R. Cross, and J.T. Curnutte. 2003. Chronic granulomatous disease. *Current opinion in immunology* 15:578-584.
- Hitoshi, Y., J. Lorens, S.I. Kitada, J. Fisher, M. LaBarge, H.Z. Ring, U. Francke, J.C. Reed, S. Kinoshita, and G.P. Nolan. 1998. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity* 8:461-471.
- Honjo, K., Y. Kubagawa, and H. Kubagawa. 2012. Is Toso an antiapoptotic protein or an Fc receptor for IgM? *Blood* 119:1789-1790.
- Honke, N., N. Shaabani, G. Cadeddu, U.R. Sorg, D.E. Zhang, M. Trilling, K. Klingel, M. Sauter, R. Kandolf, N. Gailus, N. van Rooijen, C. Burkart, S.E. Baldus, M. Grusdat, M. Lohning, H. Hengel, K. Pfeffer, M. Tanaka, D. Haussinger, M. Recher, P.A. Lang, and K.S. Lang. 2012. Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus. *Nature immunology* 13:51-57.
- Husemann, J., A. Obstfeld, M. Febbraio, T. Kodama, and S.C. Silverstein. 2001. CD11b/CD18 mediates production of reactive oxygen species by mouse and human macrophages adherent to matrixes containing oxidized LDL. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21:1301-1305.
- Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology* 5:987-995.
- Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327:291-295.
- Joiner, K.A., T. Ganz, J. Albert, and D. Rotrosen. 1989. The opsonizing ligand on *Salmonella typhimurium* influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes. *The Journal of cell biology* 109:2771-2782.
- Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E.G. Pamer, D.R. Littman, and R.A. Lang. 2002. In vivo depletion of



- CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17:211-220.
- Kain, R., D.A. Firmin, and A.J. Rees. 2010. Pathogenesis of small vessel vasculitis associated with autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens: new insights from animal models. *Current opinion in rheumatology* 22:15-20.
- Karasuyama, H., and F. Melchers. 1988. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *European journal of immunology* 18:97-104.
- Khwaja, A., J.E. Carver, and D.C. Linch. 1992. Interactions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), granulocyte CSF, and tumor necrosis factor alpha in the priming of the neutrophil respiratory burst. *Blood* 79:745-753.
- Kjeldsen, L., D.F. Bainton, H. Sengelov, and N. Borregaard. 1993. Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood* 82:3183-3191.
- Kjeldsen, L., O.W. Bjerrum, J. Askaa, and N. Borregaard. 1992. Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules. *The Biochemical journal* 287 ( Pt 2):603-610.
- Kobayashi, S.D., J.M. Voyich, A.R. Whitney, and F.R. DeLeo. 2005. Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *Journal of leukocyte biology* 78:1408-1418.
- Kocks, C., E. Gouin, M. Tabouret, P. Berche, H. Ohayon, and P. Cossart. 1992. L. monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* 68:521-531.
- Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91:661-672.
- Kostmann, R. 1956. Infantile genetic agranulocytosis; agranulocytosis infantilis hereditaria. *Acta paediatrica. Supplementum* 45:1-78.
- Kubagawa, H., S. Oka, Y. Kubagawa, I. Torii, E. Takayama, D.W. Kang, G.L. Gartland, L.F. Bertoli, H. Mori, H. Takatsu, T. Kitamura, H. Ohno, and J.Y. Wang. 2009. Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcmuR) in humans. *The Journal of experimental medicine* 206:2779-2793.
- Lang, P.A., M. Recher, N. Honke, S. Scheu, S. Borkens, N. Gailus, C. Krings, A. Meryk, A. Kulawik, L. Cervantes-Barragan, N. Van Rooijen, U. Kalinke, B. Ludewig, H. Hengartner, N. Harris, D. Haussinger, P.S. Ohashi, R.M. Zinkernagel, and K.S. Lang. 2010. Tissue macrophages suppress viral replication and prevent severe immunopathology in an interferon-I-dependent manner in mice. *Hepatology* 52:25-32.
- Le, Y., P.M. Murphy, and J.M. Wang. 2002. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends in immunology* 23:541-548.
- Lecuit, M., S. Vandormael-Pournin, J. Lefort, M. Huerre, P. Gounon, C. Dupuy, C. Babinet, and P. Cossart. 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292:1722-1725.
- Lee, W.Y., K.H. Baek, E.J. Rhee, H.J. Tae, K.W. Oh, M.I. Kang, K.W. Lee, S.W. Kim, C.C. Kim, and E.S. Oh. 2004. Impact of circulating bone-resorbing cytokines on the subsequent bone loss following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 34:89-94.
- Li, F.J., Y. Kubagawa, M.K. McCollum, L. Wilson, T. Motohashi, L.F. Bertoli, J.C. Barton, S. Barnes, R.S. Davis, and H. Kubagawa. 2011. Enhanced levels of both the membrane-bound and soluble forms of IgM Fc receptor (FcmuR) in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 118:4902-4909.

- Lominadze, G., D.W. Powell, G.C. Luerman, A.J. Link, R.A. Ward, and K.R. McLeish. 2005. Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 4:1503-1521.
- Maallem, H., K. Sheppard, and J. Fletcher. 1982. The discharge of primary and secondary granules during immune phagocytosis by normal and chronic granulocytic leukaemia polymorphonuclear neutrophils. *British journal of haematology* 51:201-208.
- Mackaness, G.B. 1962. Cellular resistance to infection. *The Journal of experimental medicine* 116:381-406.
- Mandel, T.E., and C. Cheers. 1980. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: histopathology of listeriosis in resistant and susceptible strains. *Infection and immunity* 30:851-861.
- Mazzone, A., and G. Ricevuti. 1995. Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica* 80:161-175.
- Means, T.K., and A.D. Luster. 2010. Integrins limit the Toll. *Nat Immunol* 11:691-693.
- Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 1:135-145.
- Medzhitov, R., and C. Janeway, Jr. 2000. Innate immunity. *The New England journal of medicine* 343:338-344.
- Metcalf, D. 1991. Control of granulocytes and macrophages: molecular, cellular, and clinical aspects. *Science* 254:529-533.
- Migeotte, I., D. Communi, and M. Parmentier. 2006. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine & growth factor reviews* 17:501-519.
- Mocsai, A., C.L. Abram, Z. Jakus, Y. Hu, L.L. Lanier, and C.A. Lowell. 2006. Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol* 7:1326-1333.
- Mollinedo, F., M. Nakajima, A. Llorens, E. Barbosa, S. Callejo, C. Gajate, and A. Fabra. 1997. Major co-localization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils. *The Biochemical journal* 327 ( Pt 3):917-923.
- Morel, F., J. Doussiere, and P.V. Vignais. 1991. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *European journal of biochemistry / FEBS* 201:523-546.
- Nathan, C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews. Immunology* 6:173-182.
- Navarini, A.A., M. Recher, K.S. Lang, P. Georgiev, S. Meury, A. Bergthaler, L. Flatz, J. Bille, R. Landmann, B. Odermatt, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 2006. Increased susceptibility to bacterial superinfection as a consequence of innate antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15535-15539.
- Nguyen, X.H., G. Fattakhova, P.A. Lang, K.S. Lang, D. Adam, N. Foger, and K.H. Lee. 2012. Antiapoptotic function of Toso (Faim3) in death receptor signaling. *Blood* 119:1790-1791.
- Nguyen, X.H., P.A. Lang, K.S. Lang, D. Adam, G. Fattakhova, N. Foger, M.A. Kamal, P. Prilla, S. Mathieu, C. Wagner, T. Mak, A.C. Chan, and K.H. Lee. 2011. Toso regulates the balance between apoptotic and nonapoptotic death receptor signaling by facilitating RIP1 ubiquitination. *Blood* 118:598-608.
- Nusse, O., and M. Lindau. 1988. The dynamics of exocytosis in human neutrophils. *The Journal of cell biology* 107:2117-2123.
- Ochsenbein, A.F., T. Fehr, C. Lutz, M. Suter, F. Brombacher, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286:2156-2159.

- Ogawa, T., H.K. Koerten, P. Brederoo, and W.T. Daems. 1983. A comparative study of primary and secondary granules in monocytopenia and myelopoiesis of mouse bone marrow. *Cell and tissue research* 228:107-115.
- Ogden, C.A., R. Kowalewski, Y. Peng, V. Montenegro, and K.B. Elkon. 2005. IGM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo. *Autoimmunity* 38:259-264.
- Pallasch, C.P., A. Schulz, N. Kutsch, J. Schwamb, S. Hagist, H. Kashkar, A. Ultsch, C. Wickenhauser, M. Hallek, and C.M. Wendtner. 2008. Overexpression of TOSO in CLL is triggered by B-cell receptor signaling and associated with progressive disease. *Blood* 112:4213-4219.
- Pallasch, C.P., and C.M. Wendtner. 2009. Overexpression of the Fas-inhibitory molecule TOSO: a novel antiapoptotic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma* 50:498-501.
- Papayannopoulos, V., K.D. Metzler, A. Hakkim, and A. Zychlinsky. 2010. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* 191:677-691.
- Park, J.W., and B.M. Babior. 1997. Activation of the leukocyte NADPH oxidase subunit p47phox by protein kinase C. A phosphorylation-dependent change in the conformation of the C-terminal end of p47phox. *Biochemistry* 36:7474-7480.
- Person, R.E., F.Q. Li, Z. Duan, K.F. Benson, J. Wechsler, H.A. Papadaki, G. Eliopoulos, C. Kaufman, S.J. Bertolone, B. Nakamoto, T. Papayannopoulou, H.L. Grimes, and M. Horwitz. 2003. Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nature genetics* 34:308-312.
- Rice, W.G., T. Ganz, J.M. Kinkade, Jr., M.E. Selsted, R.I. Lehrer, and R.T. Parmley. 1987. Defensin-rich dense granules of human neutrophils. *Blood* 70:757-765.
- Richter, G.H., A. Mollweide, K. Hanewinkel, C. Zobywalski, and S. Burdach. 2009. CD25 blockade protects T cells from activation-induced cell death (AICD) via maintenance of TOSO expression. *Scandinavian journal of immunology* 70:206-215.
- Rogers, H.W., and E.R. Unanue. 1993. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infection and immunity* 61:5090-5096.
- Ross, G.D. 2002. Role of the lectin domain of Mac-1/CR3 (CD11b/CD18) in regulating intercellular adhesion. *Immunol Res* 25:219-227.
- Sabroe, I., S.K. Dower, and M.K. Whyte. 2005a. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis* 41 Suppl 7:S421-426.
- Sabroe, I., E.C. Jones, M.K. Whyte, and S.K. Dower. 2005b. Regulation of human neutrophil chemokine receptor expression and function by activation of Toll-like receptors 2 and 4. *Immunology* 115:90-98.
- Salvesen, G., D. Farley, J. Shuman, A. Przybyla, C. Reilly, and J. Travis. 1987. Molecular cloning of human cathepsin G: structural similarity to mast cell and cytotoxic T lymphocyte proteinases. *Biochemistry* 26:2289-2293.
- Samsom, J.N., A. Annema, P.H. Groeneveld, N. van Rooijen, J.A. Langermans, and R. van Furth. 1997. Elimination of resident macrophages from the livers and spleens of immune mice impairs acquired resistance against a secondary *Listeria monocytogenes* infection. *Infection and immunity* 65:986-993.
- Schwartz, J.T., J.H. Barker, M.E. Long, J. Kaufman, J. McCracken, and L.A. Allen. 2012. Natural IgM Mediates Complement-Dependent Uptake of *Francisella tularensis* by Human Neutrophils via Complement Receptors 1 and 3 in Nonimmune Serum. *J Immunol*
- Segal, A.W. 2005. How neutrophils kill microbes. *Annual review of immunology* 23:197-223.

- Segal, A.W., M. Geisow, R. Garcia, A. Harper, and R. Miller. 1981. The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature* 290:406-409.
- Selvatici, R., S. Falzarano, A. Mollica, and S. Spisani. 2006. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *Eur J Pharmacol* 534:1-11.
- Sengelov, H. 1995. Complement receptors in neutrophils. *Critical reviews in immunology* 15:107-131.
- Sengelov, H., L. Kjeldsen, and N. Borregaard. 1993a. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol* 150:1535-1543.
- Sengelov, H., L. Kjeldsen, M.S. Diamond, T.A. Springer, and N. Borregaard. 1993b. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *The Journal of clinical investigation* 92:1467-1476.
- Senn, H.J., and W.F. Jungi. 1975. Neutrophil migration in health and disease. *Semin Hematol* 12:27-45.
- Serbina, N.V., T.P. Salazar-Mather, C.A. Biron, W.A. Kuziel, and E.G. Pamer. 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19:59-70.
- Shen, Y., M. Naujokas, M. Park, and K. Ireton. 2000. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* 103:501-510.
- Shima, H., H. Takatsu, S. Fukuda, M. Ohmae, K. Hase, H. Kubagawa, J.Y. Wang, and H. Ohno. 2010. Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM. *International immunology* 22:149-156.
- Sinha, S., W. Watorek, S. Karr, J. Giles, W. Bode, and J. Travis. 1987. Primary structure of human neutrophil elastase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:2228-2232.
- Sixl, W., D. Stunzner, and H. Withalm. 1978. [Epidemiologic and serologic study of listeriosis in man and domestic and wild animals in Austria]. *Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology* 22:460-469.
- Song, Y., and C.O. Jacob. 2005. The mouse cell surface protein TOSO regulates Fas/Fas ligand-induced apoptosis through its binding to Fas-associated death domain. *The Journal of biological chemistry* 280:9618-9626.
- Stockinger, B., and B. Hausmann. 1994. Functional recognition of in vivo processed self antigen. *International immunology* 6:247-254.
- Stockinger, B., T. Zal, A. Zal, and D. Gray. 1996. B cells solicit their own help from T cells. *The Journal of experimental medicine* 183:891-899.
- Strober, W., P.J. Murray, A. Kitani, and T. Watanabe. 2006. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nature reviews. Immunology* 6:9-20.
- Takeda, K., and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology* 17:1-14.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11:443-451.
- Theilgaard-Monch, K., S. Knudsen, P. Follin, and N. Borregaard. 2004. The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. *J Immunol* 172:7684-7693.
- Thrasher, A.J., N.H. Keep, F. Wientjes, and A.W. Segal. 1994. Chronic granulomatous disease. *Biochimica et biophysica acta* 1227:1-24.
- Toonen, R.F., and M. Verhage. 2003. Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes. *Trends in cell biology* 13:177-186.
- Unanue, E.R. 1997. Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunological reviews* 158:11-25.
- Urban, C.F., D. Ermert, M. Schmid, U. Abu-Abed, C. Goosmann, W. Nacken, V. Brinkmann, P.R. Jungblut, and A. Zychlinsky. 2009. Neutrophil extracellular traps contain

- calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS pathogens* 5:e1000639.
- van Rooijen, N., J. Bakker, and A. Sanders. 1997. Transient suppression of macrophage functions by liposome-encapsulated drugs. *Trends in biotechnology* 15:178-185.
- Vazquez-Boland, J.A., G. Dominguez-Bernal, B. Gonzalez-Zorn, J. Kreft, and W. Goebel. 2001a. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 3:571-584.
- Vazquez-Boland, J.A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft. 2001b. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical microbiology reviews* 14:584-640.
- Vire, B., A. David, and A. Wiestner. 2011. TOSO, the Fc $\mu$  receptor, is highly expressed on chronic lymphocytic leukemia B cells, internalizes upon IgM binding, shuttles to the lysosome, and is downregulated in response to TLR activation. *J Immunol* 187:4040-4050.
- Weischenfeldt, J., and B. Porse. 2008. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH protocols* 2008:pdb prot5080.
- Werz, O., E. Burkert, B. Samuelsson, O. Radmark, and D. Steinhilber. 2002. Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 99:1044-1052.
- Whyte, M.K., L.C. Meagher, J. MacDermot, and C. Haslett. 1993. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J Immunol* 150:5124-5134.
- Wientjes, F.B., J.J. Hsuan, N.F. Totty, and A.W. Segal. 1993. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *The Biochemical journal* 296 ( Pt 3):557-561.
- Winkelstein, J.A., M.C. Marino, R.B. Johnston, Jr., J. Boyle, J. Curnutte, J.I. Gallin, H.L. Malech, S.M. Holland, H. Ochs, P. Quie, R.H. Buckley, C.B. Foster, S.J. Chanock, and H. Dickler. 2000. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine* 79:155-169.
- Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80:617-653.
- Worthen, G.S., C. Haslett, A.J. Rees, R.S. Gumbay, J.E. Henson, and P.M. Henson. 1987. Neutrophil-mediated pulmonary vascular injury. Synergistic effect of trace amounts of lipopolysaccharide and neutrophil stimuli on vascular permeability and neutrophil sequestration in the lung. *The American review of respiratory disease* 136:19-28.
- Yamamoto, C., S. Yoshida, H. Taniguchi, M.H. Qin, H. Miyamoto, and Y. Mizuguchi. 1993. Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by guinea pig macrophages. *Infection and immunity* 61:1972-1979.
- Zal, T., A. Volkmann, and B. Stockinger. 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *The Journal of experimental medicine* 180:2089-2099.

## 8. *DANKSAGUNG*

Herrn Prof. Dr. Karl Sebastian Lang, danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, für die gute und intensive Betreuung sowie für die großen gestalterischen Freiheiten während des gesamten Forschungsprojekts. Vielen Dank für die andauernde Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Ulf Dittmer danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dieter Häussinger für die Möglichkeit in seinen Laborräumen arbeiten zu dürfen. Desweiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Humboldt Research Group sowie den Doktoranden und Diplomanden für die kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der TVA Düsseldorf und Essen für die fortwährende Hilfe. Ein ganz besonderer Dank gilt Konstanze Schättel für die vorbildliche Zucht der Mäuse sowie dem ständigen Entgegenkommen.

Den Mitarbeitern des Instituts für Zellbiologie sowie den ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Parasitologie schulde ich ein riesiges Dankeschön. Insbesondere bin ich Piet für jeden offenen, wenn auch des Öfteren sehr einseitigen, Schlagabtausch und die ständige Hilfsbereitschaft dankbar.

Den Korrekturlesern, Caro, Denis, Falk und Pauline möchte ich für den Fleiß und die Ausdauer beim Lesen des Manuskripts danken.

Denis "Devil" Delic möchte ich besonders dafür danken, dass er mir die jugoslawische (Tablic) Mentalität näher gebracht und mich in den letzten Jahren geformt hat. Vielen Dank für die langjährige Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank gilt Pauline Funkner, die mich über die Jahre unermüdlich unterstützt und stets aufgemuntert hat. Vielen Dank für den Zusammenhalt, die Hilfsbereitschaft und die ständige Geduld. DANKE.

Meinen Eltern danke ich sehr für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und die stete Geduld. Sie haben mir erst das Studium und die Promotion ermöglicht. Danke.

Desweiteren danke ich allen meinen Freunden.

## **9. *LEBENS LAUF***

Der Lebenslauf ist in der Onlineversion aus Gründen des Datenschutz nicht enthalten.

## 10. PUBLIKATIONSLISTE

### Publizierte Arbeiten

„Interferon-alpha Subtype 11 Activates NK Cells and Enables Control of Retroviral Infection“ Gibbert K, Joedicke JJ, **Meryk A**, Trilling M, Francois S, Duppach J, Kraft A, Lang KS, Dittmer U. *PLoS Pathog.* 2012 Aug;8(8):e1002868. Epub 2012 Aug 9.

„Cutting edge: Inhibition of IL-6 trans-signaling protects from malaria-induced lethality in mice“ Wunderlich CM, Delić D, Behnke K, **Meryk A**, Ströhle P, Chaurasia B, Al-Quraishy S, Wunderlich F, Brüning JC, Wunderlich FT. *J Immunol.* 2012 May 1;188(9):4141-4. Epub 2012 Mar 30.

“Oxidized ATP inhibits T-cell-mediated autoimmunity” Lang PA, Merkler D, Funkner P, Shaabani N, **Meryk A**, Krings C, Barthuber C, Recher M, Brück W, Häussinger D, Ohashi PS, Lang KS. *Eur J Immunol.* 2010 Sep;40(9):2401-8.

„Tissue macrophages suppress viral replication and prevent severe immunopathology in an interferon-1-dependent manner in mice“ Lang PA, Recher M, Honke N, Scheu S, Borkens S, Gailus N, Krings C, **Meryk A**, Kulawik A, Cervantes-Barragan L, Van Rooijen N, Kalinke U, Ludewig B, Hengartner H, Harris N, Häussinger D, Ohashi PS, Zinkernagel RM, Lang KS. *Hepatology.* 2010 Jul;52(1):25-32.

### In Bearbeitung

“Essential role of Toso in the T cell-dendritic cell interaction during chronic virus infection” Philipp A. Lang<sup>2,\*</sup>, **Andreas Meryk**<sup>1,\*</sup>, Pauline Funkner<sup>1,\*</sup>, Nadine Honke<sup>1</sup>, Mike Recher<sup>3</sup>, Pamela S. Ohashi<sup>2</sup>, Dieter Häussinger, Tak Mak<sup>2+</sup>, Kyeong-Hee Lee<sup>5+</sup>, and Karl S. Lang<sup>1+</sup>

“Toso regulates ROS production during granulocyte-mediated bacterial phagocytosis” Karl S. Lang<sup>1,2,3\*</sup>, Philipp A. Lang<sup>1,2\*</sup>, **Andreas Meryk**<sup>2,3\*</sup>, Louis-Martin Boucher<sup>1</sup>, Mike Tusche<sup>1</sup>, Jillian Haight<sup>1</sup>, Pauline Funkner<sup>2</sup>, Andrew Wakeham<sup>1</sup>, David R. McIlwain<sup>1</sup>, Mike Recher<sup>4</sup>, Garry P. Nolan<sup>5</sup>, Yasumichi Hitoshi<sup>6</sup>, Alexander A. Navarini<sup>7</sup>, Nadine Honke<sup>2,3</sup>, Pamela S. Ohashi<sup>1</sup>, Dieter Häussinger<sup>2</sup>, Kyeong-Hee Lee<sup>8+</sup> and Tak W. Mak<sup>1+</sup>

“Inflammatory dendritic cells participate in exhaustion of CD8<sup>+</sup> T cells during chronic virus infection” **Andreas Meryk**<sup>1,2,\*</sup>, Pauline Funkner<sup>1,\*</sup>, Marc W. Merx<sup>3</sup>, Nico van Rooijen<sup>4</sup>, Dieter Häussinger<sup>1</sup>, Philipp A. Lang<sup>1,\*</sup>, Karl S. Lang<sup>1,2,\*</sup>



## 11. ERKLÄRUNGEN

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema "Der Einfluss von Toso bei der Effektorfunktion von Granulozyten" zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Andreas Meryk befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. med. Karl Lang

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_  
Andreas Meryk

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den \_\_\_\_\_  
Andreas Meryk