

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Die Beeinflussung der Immunantwort Dendritischer Zellen durch
sCYLD bei der murinen Listeriose**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von

Rebecca Isabel Wurm

aus

Duisburg

Magdeburg

2016

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Wurm, Rebecca Isabel:

Die Beeinflussung der Immunantwort Dendritischer Zellen durch sCYLD bei der murinen Listeriose. - 2016. - 93 Bl., 19 Abb., 7 Tab.

Kurzreferat

Listeria monocytogenes (*Lm*) ist ein ubiquitär vorkommendes, grampositives, fakultativ intrazelluläres Bakterium. Humaninfektionen können nach oraler Aufnahme *Lm*-kontaminierter Nahrung auftreten. Bei immunkomprimierten, wie auch älteren Patienten, Neonaten und Schwangeren, können nach Infektion lebensbedrohliche Verläufe entstehen. Dendritische Zellen (DCs) tragen als potente Antigenpräsentierende Zellen bedeutend zur Kontrolle einer Listerieninfektion bei. Die immunologische Funktion der DCs wird wesentlich durch den NF- κ B (Nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells)-Signalweg gesteuert, der seinerseits durch Ubiquitinierung und Deubiquitinierung reguliert wird.

Ziel dieser Arbeit war es, die Beeinflussung der Immunantwort von DCs durch short CYLD (sCYLD) im Rahmen der murinen Listeriose zu erforschen. sCYLD ist eine natürlich vorkommende Splicevariante der Deubiquitinase CYLD (fl-CYLD), der Bindungsstellen für die NF- κ B-Signalmoleküle TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) und NEMO (NF- κ B essential modulator) fehlen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen die NF- κ B-Aktivität in DCs mit einer sCYLD-Überexpression bei gleichzeitig fehlender fl-CYLD-Expression erhöht ist. CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} DCs produzieren als Folge nach Infektion vermehrt Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-12 und Interleukin-10, wodurch es zu einer gesteigerten Aktivierung Interferon- γ produzierender Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) und T-Zellen kommt. Zudem präsentieren CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} DCs Listerienantigenen den CD8⁺ T-Zellen effektiver, was zu einer verstärkten, pathogenspezifischen CD8⁺ T-Zellproliferation und erhöhten IFN- γ Produktion führt. Zusammengefasst führt eine fehlende fl-CYLD-Expression bei gleichzeitiger sCYLD-Überexpression in DCs zu einer verbesserten angeborenen und erworbenen Immunantwort. Dies weist dem Gleichgewicht zwischen fl-CYLD und sCYLD eine bedeutende Rolle als Modulator antigenspezifischer T-Zell- und NK-Zellantworten zu.

Schlüsselwörter: Cyldromatosis (CYLD), short CYLD (sCYLD), Dendritische Zellen (DCs), *Listeria monocytogenes* (*Lm*), NF- κ B (Nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells)

1	Einführung	1
1.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.1.1	Pathogenese der Listeriose	2
1.1.2	Immunreaktion auf <i>Listeria monocytogenes</i>	4
1.1.2.1	Etablierung einer <i>Listeria monocytogenes</i> Infektion in Leber und Milz	4
1.1.2.2	Die Bedeutung der angeborenen Immunantwort bei der Listeriose.....	5
1.1.2.2.1	Makrophagen	5
1.1.2.2.2	Neutrophile Granulozyten	5
1.1.2.2.3	Dendritische Zellen.....	5
1.1.2.2.4	NK-Zellen	6
1.1.2.3	Die Bedeutung der erworbenen Immunantwort bei der Listeriose	6
1.1.2.3.1	T-Zellen.....	6
1.1.2.3.2	B-Zellen.....	7
1.2	Der NF- κ B-Signalweg	8
1.2.1	Der kanonische NF- κ B-Signalweg	9
1.2.2	Der nicht-kanonische NF- κ B-Signalweg	9
1.2.3	Der atypische NF- κ B-Signalweg	9
1.2.4	Der NF- κ B-Signalweg in Dendritischen Zellen.....	10
1.3	Regulation des NF- κ B-Signalwegs durch Ubiquitinierung und Deubiquitinierung	10
1.4	CYLD und sCYLD.....	11
1.4.1	CYLD.....	11
1.4.2	sCYLD.....	13
1.5	Aufgabenstellung	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Materialien.....	16
2.1.1	Zellbiologische Arbeiten	16
2.1.2	Tierexperimentelle Methoden	17
2.1.3	Infektionsbiologische Methoden.....	17
2.1.4	Molekularbiologische Methoden.....	17
2.1.5	Proteinbiochemische Methoden.....	19
2.1.5.1	Isolation von Protein und Absorptionsmessung.....	19
2.1.5.2	SDS-PAGE und Westernblot.....	19
2.1.5.3	Immunpräzipitation	20
2.1.6	Immunologische Methoden.....	21
2.1.6.1	Durchflusszytometrie	21
2.1.6.2	MACS.....	24
2.1.6.3	B3Z Hybridoma T-Zell Assay	24
2.1.7	Software.....	25
2.1.8	Geräte	25

2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Zellbiologische Arbeiten	26
2.2.2	Tierexperimentelle Methoden	26
2.2.2.1	Zucht gentechnisch veränderter Mauslinien	26
2.2.2.2	Organentnahme und Gewinnung einer Einzelzellsuspension.....	27
2.2.3	Infektionsbiologische Methoden.....	27
2.2.3.1	Anzucht von Listerien und Infektion der Mäuse	27
2.2.3.2	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten.....	28
2.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	29
2.2.4.1	Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien.....	29
2.2.4.2	Genotypisierung der Mäuse mittels PCR.....	29
2.2.4.3	Isolation von mRNA aus Gewebe und Generierung von cDNA.....	30
2.2.4.4	RT-PCR.....	32
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	32
2.2.5.1	Isolation von Protein und Absorptionsmessung.....	32
2.2.5.2	SDS-PAGE und Westernblot.....	33
2.2.5.3	Immunpräzipitation	34
2.2.6	Immunologische Methoden.....	34
2.2.6.1	Durchflusszytometrie	34
2.2.6.1.1	Extrazelluläre Färbung.....	34
2.2.6.1.2	Intrazelluläre Färbung von Zytokinen.....	35
2.2.6.1.3	Intrazelluläre Färbung von Signalmolekülen	35
2.2.6.2	MACS-Isolation.....	36
2.2.6.3	Ex-vivo NK-Zell Zytotoxizitätsassay	38
2.2.6.4	B3Z T-Zell Hybridoma-Assay.....	38
2.2.6.5	BrdU -Assay	39
2.2.7	Statistische Analyse	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Hochregulation von sCYLD in <i>Cyld</i> ^{ex7/8 fl/fl} DCs nach Listerieninfektion	40
3.2	Schutz vor letaler Listerieninfektion durch alleinige sCYLD-Expression in CD11c-Cre <i>Cyld</i> ^{ex7/8 fl/fl} DCs.....	41
3.3	Verbesserte Pathogenkontrolle bei CD11c-Cre <i>Cyld</i> ^{ex7/8 fl/fl} Mäusen.....	42
3.4	Unveränderte Listerieninvasion in CD11c-Cre <i>Cyld</i> ^{ex7/8 fl/fl} DCs.....	43
3.5	Erhöhte NF-κB-Aktivierung in CD11c-Cre <i>Cyld</i> ^{ex7/8 fl/fl} DCs.....	44
3.6	Induktion einer sCYLD unabhängigen K63-Ubiquitinierung von STAT3 in DCs durch <i>Listeria monocytogenes</i>	45
3.7	Erhöhte Zytokinproduktion durch CD11c-Cre <i>Cyld</i> ^{ex7/8 fl/fl} CD8α ⁺ DCs	46
3.8	Erhöhte Leukozytenzahlen in der Milz von CD11c-Cre <i>Cyld</i> ^{ex7/8 fl/fl} Mäusen	48

3.9	Verstärkte MHC-Klasse-II Expression in CD11c-Cre Cyld ^{ex7/8 fl/fl} DCs	50
3.10	Verstärkte Aktivierung von NK-Zellen durch CD11c-Cre Cyld ^{ex7/8 fl/fl} DCs	51
3.11	Erhöhte Zytotoxizität von CD11c-Cre Cyld ^{ex7/8 fl/fl} NK-Zellen	52
3.12	Verbesserte MHC-Klasse-I Antigenpräsentation durch CD11c-Cre Cyld ^{ex7/8 fl/fl} DCs..	52
3.13	Verbessertes CD8 ⁺ T-Zell Priming durch CD11c-Cre Cyld ^{ex7/8 fl/fl} DCs	53
3.14	Erhöhte CD8 ⁺ T-Zellproliferation in CD11c-Cre Cyld ^{ex7/8 fl/fl} Mäusen	54
4	Diskussion	56
4.1	Hochregulation von sCYLD in Cyld ^{ex7/8 fl/fl} DCs nach Listerieninfektion und Schutz vor einer letalen Listerieninfektion.....	56
4.2	Normale Invasion von Listerien, aber verstärkte Aktivierung von CD11c-Cre Cyld ^{ex7/8 fl/fl} DCs.....	57
4.3	Verstärkte Aktivierung von NK-Zellen und CD8 ⁺ T-Zellen durch CD11c-Cre Cyld ^{ex7/8 fl/fl} DCs.....	61
5	Zusammenfassung und Ausblick	63
6	Literaturverzeichnis	65
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	79
8	Anhang	80
8.1	Danksagungen	80
8.2	Ehrenerklärung.....	81
8.3	Darstellung des Bildungswegs.....	82
8.4	Publikationen und Kongressbeiträge	83

Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Aminoactinomycin
A	
Abb.	Abbildung
ActA	Actin assembly inducing protein A
Aq.dest	Aqua destillata
B	
Bcl-3	B-cell lymphoma 3
Bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
BSS	Balanced Salt Solution
C	
CD	Cluster of Differentiation (Differenzierungsantigen)
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNS)
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CPRG	Chlorophenolrot- β -D-Galaktopyranosid
Cre	Cyclization recombination
Cyld (Gen)/CYLD (Protein)	Cylindromatosis
D	
d	Tag
DCs	Dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
DUBs	Deubiquitinating enzymes (deubiquitinierende Enzyme)

E

ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase

F

FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fc	Fragment crystallisable (Rezeptor)
FKS	Fetales Kälber Serum
fl-CYLD	Full length-Cylindromatosis

G

g	Gravitationskonstante
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

H

h	Stunde
HCl	Salzsäure
Her-2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HH-Medium	Herz-Hirn-Medium
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase

I

i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IFN	Interferon
IFNGR	Interferon- γ Rezeptor
IgG1	Immunglobulin G1
IKK	I κ B α -Kinase-Komplex
IL	Interleukin
iNOS	Inducible nitric oxidase synthase
IP	Immunpräzipitation
I κ B	Inhibitor κ B

J

JAMMs Jab1/Mov34/Mpr1 Pad1 N-terminal metalloproteases

K

K Lysin

KBE Koloniebildende Einheiten

KH₂PO₄ Kaliumdihydrogenphosphat

L

LacZ β-Galaktosidase Gen (Laktose Operon)

LapB *Listeria* adhesin protein B

Lck Lymphocyte specific protein tyrosine kinase

LLO Listeriolysin O

Lm *Listeria monocytogenes* (Wildtyp)

LmOVA *Listeria monocytogenes* Ovalbumin

LPS Lipopolysaccharid

M

M-Zellen Microfold-Zellen

MACS Magnetic Activated Cell Sorting

MAPK Mitogen-activated protein kinase

MFI Mean fluorescence intensity

MgCl₂ Magnesiumchlorid

MHC-Klasse-I/-II Major Histocompatibility Complex I/II

min Minuten

MJDs Machado-Josephin Domain proteases

mRNA Messenger ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)

N

NaCl Natriumchlorid

NaF Natriumfluorid

NaHCO₃ Natriumhydrogencarbonat

NEMO NF-kappa-B essential modulator

NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NIK	NF- κ B-inducing kinase
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
O	
OTUs	Ovarian tumour proteases
OVA	Ovalbumin
P	
p.i.	Post infectionem
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	
Rel A/B	V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog A/B
RipK2	Receptor-Interacting serine/threonine-protein kinase 2
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
Rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 (Medium)
RT-PCR	Real-time PCR
S	
sCYLD	Short Cyldromatosis
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T	
TAK1	Transforming growth factor beta-activated kinase 1
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline mit Tween20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA Puffer
Tip-DCs	TNF- α /iNOS-produzierende Dendritische Zellen
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAF	TNF receptor associated factor
TRIP	TRAF-interacting protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	
Ub	Ubiquitin
UCHs	Ubiquitin C-terminal hydrolases
USPs	Ubiquitin specific proteases
Z	
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einführung

1.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes (Lm) wurde erstmals 1924 von E.G.D. Murray aus dem Blut infizierter Kaninchen isoliert (Murray et al. 1926). Zunächst als *Bacterium monocytogenes* beschrieben, wurde es später zu Ehren des britischen Chirurgen Joseph Lister, Begründer der antiseptischen Chirurgie, in *Listeria monocytogenes* umbenannt. Heute ist es eines der am besten untersuchten Pathogene und wird in der Zellbiologie und Immunologie als Prototyp für fakultativ intrazelluläre Infektionen verwendet. Die murine Listeriose hat sich über die Jahre zu einem etablierten Infektionsmodell für die Erforschung von Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen etabliert und einen signifikanten Beitrag zum Verständnis der zellulären Immunantwort geleistet.

Listeria monocytogenes ist ein ubiquitär vorkommendes, grampositives, fakultativ intrazelluläres Bakterium, dessen Übertragung über orale Aufnahme kontaminierter Nahrung erfolgt. Nach Passage der gastrointestinalen Mukosa verbreiten sich die Bakterien über die Blut- und Lymphbahn zunächst in Leber (Gregory et al. 1996) und Milz (Conlan 1996) und können in einer späteren Phase weitere Organe infizieren (Abb.1). Die Kontrolle einer Listerieninfektion hängt maßgeblich von der Immunkompetenz des infizierten Individuums ab. Bei immunkompetenten Individuen resultiert die orale Aufnahme selbst einer hohen Anzahl an Listerien meist nur in einer selbst-limitierenden, febrilen Gastroenteritis, einhergehend mit grippeähnlichen Symptomen (Ooi & Lorber 2005). Bei immunkomprimierten Patienten, wie auch älteren Patienten, Neonaten und Schwangeren, können hingegen lebensbedrohlichen Verläufe auftreten. Am häufigsten sind Kinder unter einem Jahr und über Sechzig-jährige von einer Listeriose betroffen. Klinisch manifestiert sich dies häufig als Meningitis bzw. Meningoenzephalitis (Jurado et al. 1993), selten können auch Pneumonien (Koufakis et al. 2015) und Augeninfektionen auftreten (Weber et al. 2015). Bei Neonaten führt eine Infektion häufig zu Enterokolitiden (Larsson et al. 1978), bei infizierten Schwangeren kann eine Infektion des Fetus auftreten, was zu einem Abort (Mylonakis et al. 2002) oder der Granulomatosis infantiseptica führen kann (Erdmann & Potel 1953).

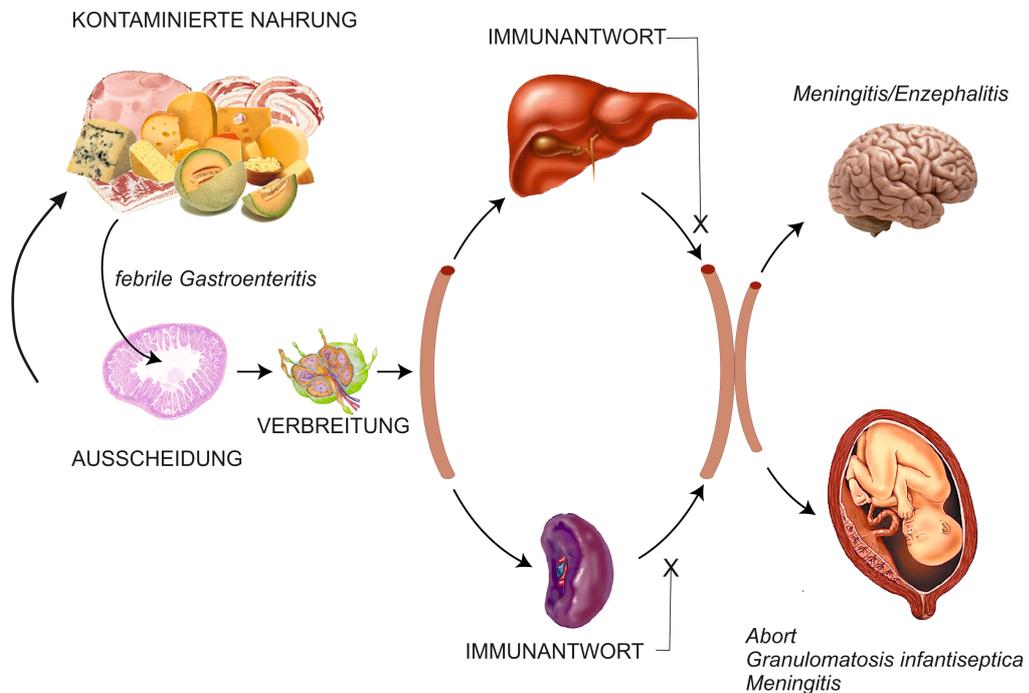


Abb. 1 Pathophysiologie der Listerieninfektion

Durch kontaminierte Nahrungsmittel aufgenommene Listerien passieren die gastrointestinale Mukosa, disseminieren über die Lymph- und Blutbahn zunächst in Leber und Milz sowie nachfolgend in weitere Organe. Über Passage der Blut-Hirn-Schranke kann das ZNS, über die Blut-Plazenta-Schranke der Fetus infiziert werden (modifiziert nach Vázquez-Boland et al. 2001 und Lebreton-Mansuy 2016).

1.1.1 Pathogenese der Listeriose

Nach oraler Aufnahme muss *L. monocytogenes* zunächst die Schutzbarriere des sauren Magenmilieus überwinden (Ho et al. 1986; Schuchat et al. 1992). Im Dünndarm angekommen fungieren M-Zellen, Bestandteile des Follikel-assoziierten Epithels, welches die Peyer-Plaques des Dünndarms bedeckt, als Eintrittspunkt (Jensen et al. 1998). *L. monocytogenes* bindet über die bakteriellen Proteine Internalin A und B an den auf diesen Zellen vorhandenen Rezeptor E-Cadherin (Mengaud et al. 1996; Drevets et al. 1995). Das Oberflächenadhesin LapB wird ebenfalls für den Eintritt in eukaryotische Zellen benötigt (Reis et al. 2010).

Nach Eintritt in die Wirtszelle werden die Listerien zunächst von Phagosomen umschlossen (Gaillard et al. 1987) deren Ausreifung zu Phagolysosomen durch das Bakterium gehemmt wird (Alvarez-Dominguez et al. 1997). Daraufhin überwinden die Listerien das sie umgebende Phagosom durch Sekretion von Listeriolysin O (LLO) und gelangen in das Zytoplasma (Grenningloh et al. 1997). Im Zytoplasma

exprimieren sie das Actin-assembly-inducing protein A (ActA), welches Aktin der Wirtszelle an einem Pol des Bakteriums akkumuliert und zur Formation eines Aktinschweifs führt, mit dessen Hilfe sich die Listerien aktiv in der Wirtszelle bewegen können (Theriot et al. 1992; Southwick & Purich 1998). Gelangen die Listerien zur Zellmembran der Wirtszelle, haftet der Aktinschweif an diese an und es bilden sich Pseudopodien aus, die uninfizierte Nachbarzellen penetrieren. Die Zellmembran der Nachbarzelle stülpt sich um diese Pseudopodien herum aus und nimmt das Bakterium auf (Pust et al. 2005; Robbins et al. 1999). In der Nachbarzelle sind die Listerien somit nun zusätzlich von einer Sekundärvakuole umgeben, diese wird durch Sezernierung von Phospholipase C, Metalloprotease und LLO (Pamer 2004) überwunden. Durch die direkte Ausbreitung von Zelle zu Zelle wird die humorale Immunantwort des Wirts unterlaufen. Dies stellt einen wichtigen Immunevasionsmechanismus der Listerien dar (Abb.2).

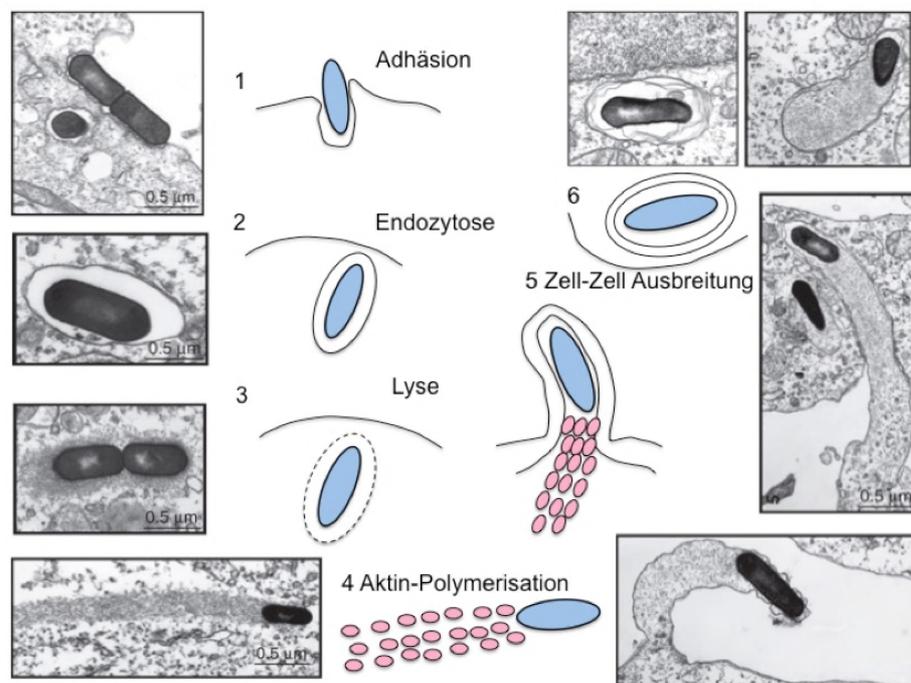


Abb. 2 Pathogenese von *Listeria monocytogenes*

1) Die Adhäsion und **2)** Endozytose von *Lm* findet durch Bindung an Zelloberflächenproteine mittels Internalin A und B statt. **3)** Nach erfolgter Endozytose lysiert das Bakterium die umgebende phagozytische Vakuole durch Sekretion von LLO. **4)** Im Zytoplasma exprimiert *Lm* ActA. Dies führt zur Bildung eines Aktinschweifs. **5)** Nach Ausbreitung in der Zelle bewegt sich das Bakterium mit Hilfe dieses Schweifes von Zelle zu Zelle fort. **6)** In der Nachbarzelle wird das Bakterium von einer Sekundärvakuole umgeben. Dieser entkommt das Bakterium durch Sekretion von Phospholipasen, Metalloproteasen und LLO (modifiziert nach Cossart 2011).

1.1.2 Immunreaktion auf *Listeria monocytogenes*

1.1.2.1 Etablierung einer *Listeria monocytogenes* Infektion in Leber und Milz

Nach Passage der gastrointestinalen Mukosa disseminieren die Bakterien über den Blut- und Lymphstrom zunächst in Leber und Milz (Gregory et al. 1996; Conlan 1996). Ein Großteil der Bakterien akkumuliert in den residenten Makrophagen der Leber, den Kupffer-Zellen, und wird von diesen abgetötet (Ebe et al. 1999), während sich die überlebenden Bakterien in Hepatozyten vermehren können (Conlan 1996; Gregory et al. 1992). Von infizierten Hepatozyten produzierte Chemokine und Zytokine führen zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, welche für die Kontrolle der akuten Phase der Listerieninfektion in der Leber essentiell sind (Rogers & Unanue 1993). Zwei bis vier Tage nach Beginn der Infektion werden neutrophile Granulozyten durch Zellen des mononukleär-phagozytierenden Systems und Lymphozyten ersetzt, die charakteristische Granulome bilden und somit eine Weiterverbreitung der Bakterien verhindern (Heymer et al. 1988).

Die Milz ist ein wichtiger Replikationsort für *L. monocytogenes* und trägt als sekundäres lymphatisches Organ zugleich maßgeblich zur Infektionsbewältigung bei. Histomorphologisch lässt sich in der Milz eine B- und T-Zellen enthaltende weiße Pulpa (periarterioläre lymphatische Scheiden) und eine rote Pulpa, die durch venöse Sinusoide gebildet wird, unterscheiden. Diese beiden Regionen werden durch die Marginalzone voneinander getrennt, in der sich Makrophagen und Dendritische Zellen (DCs) befinden. In der Milz infiziert *L. monocytogenes* zunächst CD8 α ⁺ DCs der Marginalzone (Neuenhahn et al. 2006), welche daraufhin in die T-Zellregion der periarteriolären lymphatischen Scheiden wandern (Idoyaga et al. 2009). Im Verlauf werden auch CD8 α ⁻ DCs sowie weitere Zelltypen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten infiziert (Aoshi et al. 2009).

1.1.2.2 Die Bedeutung der angeborenen Immunantwort bei der Listeriose

1.1.2.2.1 Makrophagen

In der Leber werden Listerien zunächst von residenten Makrophagen, sogenannten Kupffer-Zellen aufgenommen. Auch in der Milz gehören Makrophagen nach initialer Infektion von $CD8\alpha^+$ DCs zu den mehrheitlich infizierten Zelltypen. Makrophagen sind Antigenpräsentierende Zellen und produzieren die für die Kontrolle und Elimination der Listeriose wichtigen Zytokine IL-6 (Liu & Cheers 1993), TNF- α (Havell 1987) und IL-12 (Skeen et al. 1996). Zudem sind sie durch Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies in der Lage Listerien abzutöten (MacMicking et al. 1997; Forman & Torres 2002).

1.1.2.2.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten spielen vor allem bei der Kontrolle und Elimination einer Listerien-Infektion in der Leber eine wichtige Rolle. Angelockt durch IL-6 (Dalrymple et al. 1995) eliminieren sie Listerien durch Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (Segal 2005).

1.1.2.2.3 Dendritische Zellen

DCs sind potente Antigenpräsentierende Zellen, die in lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen vorkommen, und CD11c und MHC-Klasse-I und -II Oberflächenantigene aufweisen. Die wichtige Rolle von DCs zur Etablierung einer Listerieninfektion wird durch Studien von Neuenhahn et al. (2006) und Kang et al. (2008) unterstrichen, die zeigten, dass Mäuse ohne DCs gegen eine Listerieninfektion der Milz resistent sind. Die $CD8\alpha^+$ DC-Subpopulation ist der am frühesten infizierte Zelltyp der Milz und essentiell für die Etablierung einer Listerieninfektion (Neuenhahn et al. 2006; Edelson et al. 2011).

Darüber hinaus sind DCs wichtige Produzenten proinflammatorischer Mediatoren. Von Monozyten abstammende inflammatorische Tip-DCs produzieren überwiegend TNF- α und induzierbare NO-Synthasen (iNOS) (Serbina et al. 2003), während $CD8\alpha^+$ DCs maßgebliche Produzenten von IL-12 sind (Kapadia et al. 2011; Mitchell et al. 2011). Zusätzlich zu ihrer Kommunikation mit anderen Zellpopulationen durch Zytokine, sind DCs als Antigenpräsentierende Zellen in der Lage T-Zellen zu aktivieren und somit wichtige Vermittler an der Schnittstelle zwischen angebore-

ner und erworbener Immunantwort. $CD8\alpha^+$ DCs aktivieren $CD8^+$ T-Zellen durch MHC-Klasse-I Antigenpräsentation (Lin et al. 2008), während $CD8\alpha^-$ DCs vorrangig MHC-Klasse-II gebundene Antigene an $CD4^+$ T-Zellen präsentieren.

1.1.2.2.4 NK-Zellen

NK-Zellen sind zytotoxische Lymphozyten, die durch Produktion von Perforinen und Granzymen zur Apoptose von Zielzellen führen. Aktiviert durch Zytokine wie IL-12 und $TNF-\alpha$ produzieren NK-Zellen $IFN-\gamma$, welches zu einer gesteigerten Bakterizidität von Makrophagen führt (Bancroft et al. 1989). Die wichtige Rolle von $IFN-\gamma$ wird durch eine verminderte Infektionsbewältigung bei Mäusen mit Störungen der für $IFN-\gamma$ (Harty & Bevan 1995) und $IFN-\gamma$ Rezeptor (IFNGR) (Huang et al. 1993) kodierenden Gene illustriert.

1.1.2.3 Die Bedeutung der erworbenen Immunantwort bei der Listeriose

Während die angeborene Immunantwort das Ausmaß der Listerieninfektion in der initialen Infektionsphase begrenzt, sind listerienspezifische $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen essentiell für die Elimination des Pathogens. Zudem entwickeln sich bei primärer Infektion mit *L. monocytogenes* Gedächtnis $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, die spezifisch vor einer Infektion schützen (Bancroft et al. 1989; Bhardwaj et al. 1998).

1.1.2.3.1 T-Zellen

Zur Initiierung einer T-Zellantwort müssen bakterielle Antigene zunächst von infizierten Zellen präsentiert werden. Dies geschieht über zwei hauptsächliche Mechanismen. 1) Infizierte Zellen wie $CD8\alpha^+$ DCs können von Listerien freigesetzte Proteine proteasomal degradieren und über MHC-Klasse-I Moleküle an $CD8^+$ T-Zellen präsentieren. Diese lysieren infizierte Zielzellen durch Perforine und Granzyme und exponieren somit die enthaltenen Listerien, welche daraufhin durch Makrophagen abgetötet werden können. Des Weiteren führt die durch IL-12 verstärkte $IFN-\gamma$ -Produktion von $CD8^+$ T-Zellen zur Aktivierung von Makrophagen (D’Orazio et al. 2006; Harty & Badovinac 2002). 2) Professionelle Antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen und DCs präsentieren Antigene von lysosomal abgebauten Bakterien über MHC-Klasse-II Moleküle an $CD4^+$ T-Zellen (Hsieh et al. 1993; Skoberne et al. 2002). Unter den DCs nehmen wiederum $CD8\alpha^+$ DCs eine Sonderstellung ein, da sie in der Lage sind Antigen sowohl MHC-I als auch MHC-II gebunden zu präsentieren (Belz et al. 2005; Lemos et al. 2003).

CD4⁺ T-Zellen produzieren nach Infektion ebenfalls IFN- γ (Daugelat et al. 1994), spielen im Vergleich zu CD8⁺ T-Zellen aber bei der Listeriose eine untergeordnete Rolle (Kursar et al. 2004). Allerdings zeigten Studien von Sun & Bevan (2003) und Shedlock & Shen (2003), dass die optimale Entwicklung eines funktionalen CD8⁺ T-Zell-Gedächtnisses nur mit Hilfe von CD4⁺ T-Zellen möglich ist.

1.1.2.3.2 B-Zellen

Aufgrund der intrazellulären Vermehrung von *L. monocytogenes* spielen B-Zellen und Antikörper in der Infektionsbewältigung eine untergeordnete Rolle. Eventuell von Bedeutung sind natürlich vorkommende Antikörper naiver Mäuse zur Verhinderung der Disseminierung der Infektion (Ochsenbein et al. 1999). Des Weiteren sind B-Zellen wichtig für die Aufrechterhaltung von Gedächtnis T-Zellen (Shen et al. 2003).

1.2 Der NF- κ B-Signalweg

Der NF- κ B-Signalweg ist ein zentraler Mediator der Immunantwort, da er eine Vielzahl zellulärer Prozesse reguliert. Zielgene dieses Signalwegs beeinflussen unter anderem Zellentwicklung, Zellwachstum (Gerondakis & Siebenlist 2010), Apoptose (Dutta et al. 2006) und immunologische Prozesse (Hayden & Ghosh 2011). Fehlregulationen sind mit der Entstehung von dysreguliertem Entzündungsgeschehen, Autoimmunkrankheiten (Courtois & Gilmore 2006) und malignen Erkrankungen (Bassères & Baldwin 2006) assoziiert.

Der NF- κ B Proteinkomplex besteht aus fünf Elementen: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50/p105) und NF- κ B2 (p52/p100). Es sind drei NF- κ B Signalwege bekannt, der kanonische, der nicht-kanonische sowie der atypische Signalweg (Abb.3).

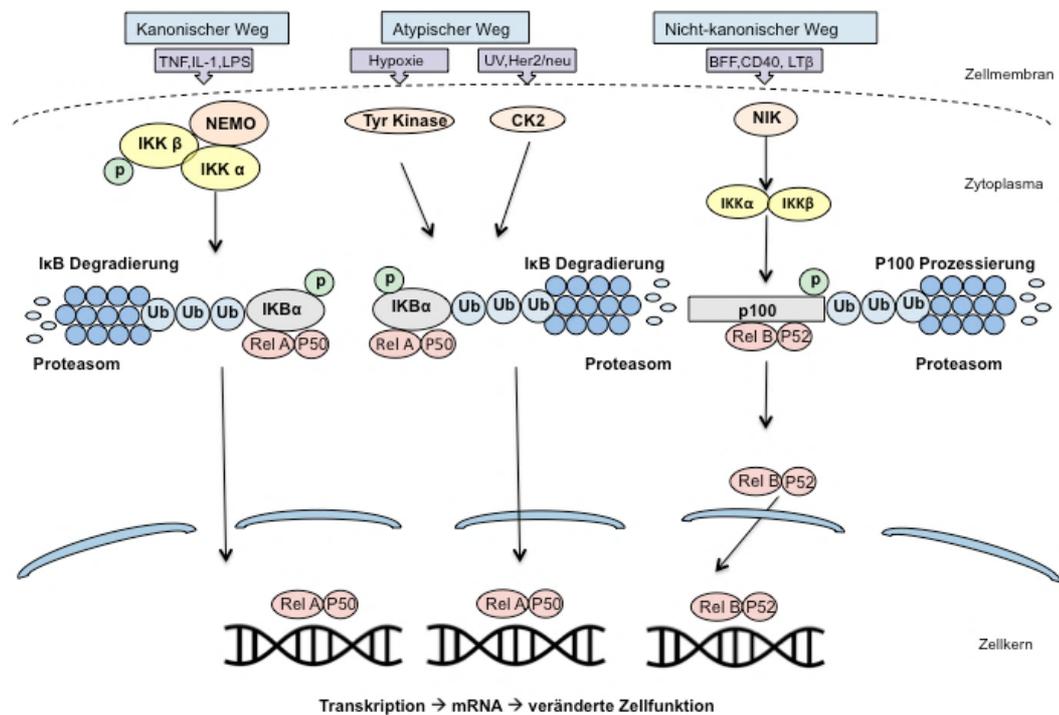


Abb. 3 Aktivierung des kanonischen-, des nicht-kanonischen- und des atypischen NF- κ B-Signalwegs

1) Der kanonische NF- κ B-Signalweg wird durch TNF- α , IL-1 und LPS induziert. Aktivierung von IKK führt zur Phosphorylierung von I κ B α , was zur Ubiquitinierung und nachfolgendem Abbau durch das 26S Proteasom führt. Dies führt zur Freisetzung des RelA p50 Komplexes, der in den Nukleus transloziert und die Transkription initiiert. **2)** Beim nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweg wird IKK α durch die NF- κ B-induzierende Kinase (NIK) aktiviert. IKK α phosphoryliert daraufhin die NF- κ B Untereinheit p100. Dies führt zur Prozessierung von p100 zu p52 durch das Proteasom. P52 bildet dann ein Heterodimer mit RelB, welches in den Nukleus transloziert und die Transkription initiiert. **3)** Der atypische NF- κ B Signalweg ist IKK-unabhängig. Hier wird I κ B α durch die Casein-Kinase-II (CK2) und andere Tyrosinkinasen phosphoryliert und somit der NF- κ B Signalweg aktiviert (modifiziert nach Perkins 2007).

1.2.1 Der kanonische NF- κ B-Signalweg

Beim kanonischen NF- κ B-Signalweg liegt NF- κ B gebunden an inhibitorische I κ B-Proteine als inaktive Form im Zytoplasma vor (Hayden & Ghosh 2012) (Abb.3). Nach Stimulation durch proinflammatorische Mediatoren wie TNF- α , Lipopolysaccharide (LPS) oder IL-1 β kommt es, vermittelt durch Signalmoleküle wie TNF Rezeptor assoziierter Faktor 2 und 6 (TRAF2/TRAF6) und NF- κ B essential modulator (NEMO), zur Aktivierung des Inhibitor κ B (I κ B) Kinase-Komplex (IKK-Komplex) (Hayden & Ghosh 2012). IKK β phosphoryliert daraufhin I κ B α , welches nach Ubiquitinierung durch das 26S Proteasom abgebaut wird. Der dadurch freigesetzte RelA-p50-Komplex transloziert in den Nukleus, bindet dort an regulatorische Regionen der DNA und initiiert die Transkription von Zielgenen.

1.2.2 Der nicht-kanonische NF- κ B-Signalweg

Der nicht-kanonische NF- κ B-Signalweg ist ebenfalls für die Regulation von Immunantworten, insbesondere in B-Zellen wichtig (Gardam & Brink 2014).

NF- κ B wird durch Bindung an p100 in inaktivem Zustand gehalten. Der B-Zell aktivierende Faktor (BAFF), Lymphotoxin- β (LT β) und CD40 führen unter Vermittlung der NF- κ B induzierenden Kinase (NIK) zur Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit von IKK α (Mahoney et al. 2008; Zarnegar et al. 2008) (Abb.3). IKK α phosphoryliert daraufhin NF- κ B2/p100, was zur proteolytischen Abspaltung der C-terminalen inhibitorischen Domäne des phosphorylierten p100 führt. Der somit freigesetzte p52-RelB-Komplex transloziert in den Nukleus und initiiert die Transkription von Zielgenen (Zarnegar et al. 2008).

1.2.3 Der atypische NF- κ B-Signalweg

Der atypische NF- κ B-Signalweg reguliert Immunfunktionen (Hayden et al. 2006). Als Antwort auf Hypoxie (Culver et al. 2010), UV-Strahlung (Chang et al. 2011) oder die Expression des Onkogens Her-2/neu (Pianetti et al. 2001) wird der NF- κ B-Signalweg, vermittelt durch Protein-Tyrosinkinase (PTK) oder Casein-Kinase II (CK2), aktiviert. PTK und CK2 phosphorylieren hierzu I κ B α . Dies führt zu dessen proteasomalen Abbau und der RelA-p50 Komplex kann in den Nukleus translozieren (Perkins 2007).

1.2.4 Der NF- κ B-Signalweg in Dendritischen Zellen

Der NF- κ B-Signalweg beeinflusst Entwicklung, Überleben und Zytokinproduktion von DCs. Bei Mäusen, denen die NF- κ B-Signalmoleküle p50 und RelA fehlten, waren keine CD11c⁺ DCs in der Milz nachweisbar (Ouaaz et al. 2002). Bei fehlendem p50 und cRel produzierten DCs kein IL-12 (Ouaaz et al. 2002; Hilliard et al. 2002). Studien von Zanetti et al. (2003) zeigten, dass DCs von Rel B^{-/-} Mäusen ihre Fähigkeit T-Zellen zu primen verloren. DCs von TRAF6 defizienten Mäusen konnten nach Stimulation durch mikrobielle Antigene weder inflammatorische Zytokine bilden, noch MHC-Klasse-II Antigene hochregulieren (Kobayashi et al. 2003).

1.3 Regulation des NF- κ B-Signalwegs durch Ubiquitinierung und Deubiquitinierung

Ubiquitine sind regulatorische Proteine, die Substratmoleküle durch Bindung an Lysinreste posttranslational modifizieren können (Hershko & Ciechanover 1998). Ein Ubiquitin-Molekül besitzt sieben Lysinreste (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63). Jeder dieser Lysinreste kann über das carboxyterminale Ende aneinander gebunden werden und so eine Polyubiquitinkette bilden. Die Ubiquitinierung läuft in drei Schritten ab. Zunächst wird Ubiquitin in einer ATP-abhängigen Reaktion durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym 1 (E1) aktiviert. Daraufhin wird das aktivierte Ubiquitin durch eine Thioesterverbindung an das Ubiquitin-konjugierende Enzym 2 (E2) gebunden. Schlussendlich wird Ubiquitin durch das Ubiquitin-ligierende Enzym 3 (E3) über eine Isopeptidverbindung an das Zielprotein gebunden (Hershko & Ciechanover 1998) (Abb.4). Je nachdem über welchen Lysinrest die Polyubiquitinkette verbunden ist, resultieren unterschiedliche Konsequenzen für das Substratmolekül. Eine Ubiquitinierung an den Lysinresten K48 und K29 führt beispielsweise zum Abbau des Substratmoleküls durch das 26S Proteasom (Hershko & Ciechanover 1998; Hochstrasser 1995). K63-verbundene Polyubiquitinketten regulieren hingegen Funktionen wie Proteintransport, Proteininteraktionen, DNA-Abbau und Signaltransduktion (Chen 2005; Adhikari et al. 2007; Hershko & Ciechanover 1998).

Der Prozess der Ubiquitinierung ist reversibel. Ubiquitinmoleküle können von Substratproteinen durch deubiquitinierende Enzyme (DUBs) proteolytisch entfernt werden. Abhängig von ihrer katalytischen Domäne werden deubiquitinierende Enzyme in die Ubiquitin-Familien der carboxy-terminalen Hydrolasen (UCHs),

Ubiquitin-spezifische Proteasen (USPs), Ovarielle Tumor-assoziierten Proteasen (OTUs), Machado-Joseph Krankheit Protein Abschnitt Proteasen (MJDs) und Jab1/Pab1/MPN-Abschnitt enthaltenden Metalloenzyme (JAMMs) eingeteilt (Nijman et al. 2005; Sun 2008). Die Familie der Ubiquitin-spezifische Proteasen (USPs) ist der am häufigsten vertretene Typ der deubiquitinierenden Enzyme (Gong & Leznik 2007).

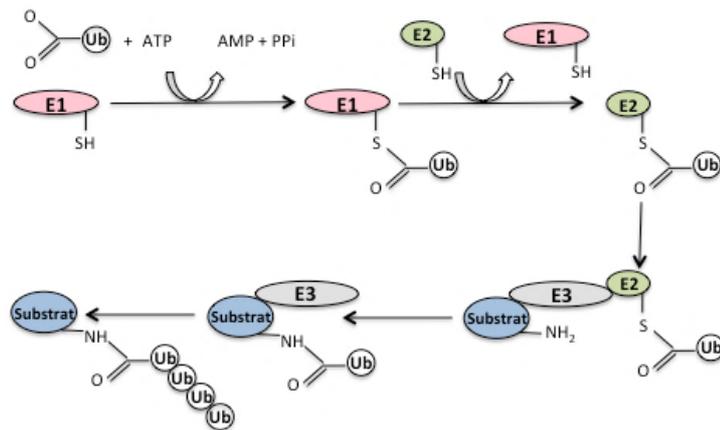


Abb. 4 Schritte der Ubiquitinierung

Für die drei Schritte der Ubiquitinierung werden das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1, das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2, welches Ubiquitin auf das E3-Enzym transferiert, und die Ubiquitin-Ligase E3, welche das Ubiquitin Molekül an das Substratprotein legiert, benötigt (modifiziert nach Rieser et al. 2013).

1.4 CYLD und sCYLD

1.4.1 CYLD

Studien zum familiären Zylindrom, einem Tumor der Hautanhangsgebilde, führten zur Identifikation des Cylindromatosis-Gens (Cyld) als Tumorsuppressorgen (Biggs et al. 1995; Bignell et al. 2000). Weitere Studien identifizierten CYLD (fl-CYLD) als negativen Regulator des NF- κ B-Signalwegs (Kovalenko et al. 2003).

Als Vertreter der Ubiquitin-spezifischen Proteasen (USPs) gehört CYLD zu den deubiquitinierenden Enzymen und entfernt K63-gebundene Polyubiquitinketten von Signalmolekülen wie NEMO (Brummelkamp et al. 2003), TRAF2 (Kovalenko et al. 2003), TRIP (Regamey et al. 2003), TRAF6 (Trompouki et al. 2003), TRAF7

(Yoshida et al. 2005), Rip1 (Wright et al. 2007; Moquin et al. 2013), TAK1 (Koga et al. 2008), Lck (Reiley et al. 2004), Bcl-3 (Massoumi et al. 2006), STAT3 (Nishanth et al. 2013) sowie RipK2 (Wex et al. 2015) und greift so hemmend in den NF- κ B-Signalweg ein.

CYLD spielt eine entscheidende Rolle in der Onkogenese einer Vielzahl hämatologischer Erkrankungen wie der Leukämie (Wu et al. 2014), dem malignen Melanom (Ke et al. 2013), dem Magenkarzinom (Sun et al. 2015) und dem hepatozellulären Karzinom (Huang et al. 2015). Verminderte Cyld-mRNA ist zudem mit chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der Colitis ulcerosa und Morbus Crohn assoziiert (Costello et al. 2005). Des Weiteren spielt CYLD eine Rolle in der Apoptose (Brummelkamp et al. 2003), Nekroptose (Moquin et al. 2013), Embryogenese (Zhao et al. 2015), Spermatogenese (Wright et al. 2007), in der Zellzyklusprogression (Wickström et al. 2010) und Zellmigration (Gao et al. 2008).

Verschiedene Mausmodelle illustrieren, dass CYLD im Rahmen von Infektionen sowohl einen protektiven als auch einen schädlichen Einfluss haben kann. Studien von Lim et al. (2007) zeigten, dass CYLD-defiziente Mäuse (Cyld^{-/-}) nach intratrachealer Inokulation von *E.coli* eine höhere Anfälligkeit für *E.coli*-assoziierte Pneumonien und erhöhte Mortalitätsraten aufwiesen. Der NF- κ B Inhibitor I κ B α wurde bei Cyld^{-/-} Mäusen verstärkt abgebaut, was in einer erhöhten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs resultierte. Nishanth et al. (2013) zeigten, dass C57BL/6 Cyld^{-/-} Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtyp-Artgenossen auch Infektionen mit hohen Listeriendosen überlebten und identifizierten als zugrunde liegenden Mechanismus die fehlende Hemmung der STAT3 abhängigen Fibrinproduktion durch CYLD. Cyld^{-/-} Mäuse wiesen zudem eine höhere Anfälligkeit für chemisch-induzierte Hauttumoren (Massoumi et al. 2006), chronische entzündliche Darmerkrankungen und Dextransulfat-induzierte Kolonkarzinome (Zhang et al. 2006) sowie für Osteoporose (Jin et al. 2008) auf.

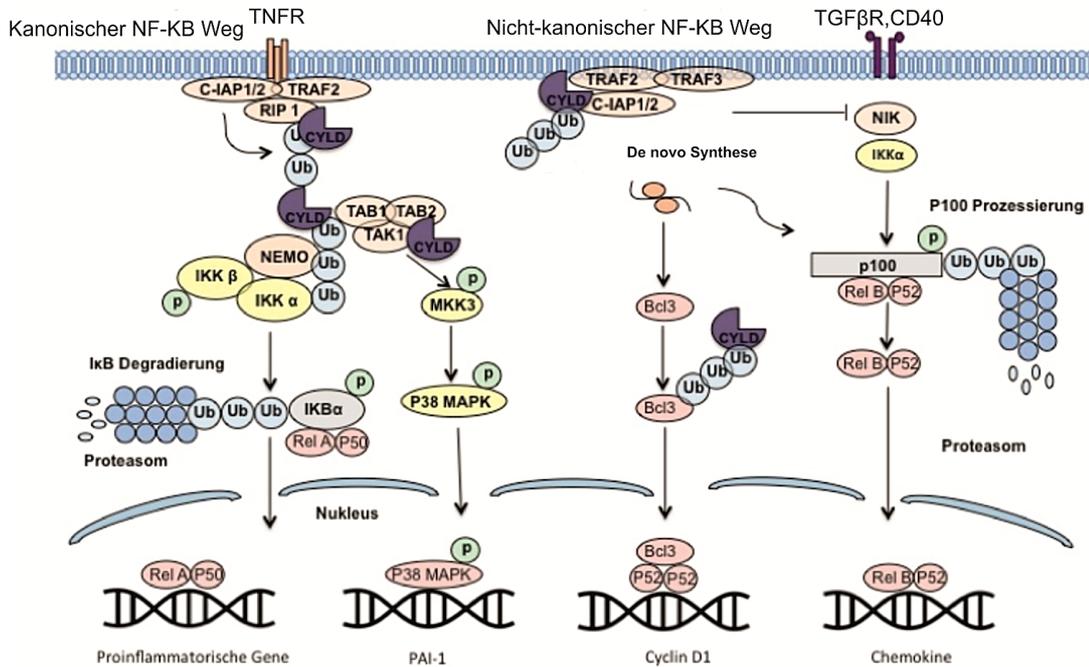


Abb. 5 Regulation des NF-κB- und MAPK-Wegs durch CYLD

CYLD reguliert den kanonischen NF-κB-Weg durch Deubiquitinierung der Signalmoleküle RIP1, TRAF2, TRAF6, TRAF7, RIPK2 und NEMO. CYLD inhibiert zudem indirekt den nicht-kanonischen NF-κB-Signalweg, da die Expression der Signalmoleküle RelB und NF-κB2 p100, sowie des Kofaktors Bcl3 abhängig vom kanonischen NF-κB ist. Zusätzlich inhibiert CYLD den MAPK Signalweg durch Deubiquitinierung von TAK1 (modifiziert nach Sun 2010 und Nishanth 2013).

1.4.2 sCYLD

Zusätzlich zu Cyld-Mutationen gibt es natürlich vorkommende Splicevarianten. Hövelmeyer et al. (2007) konnten zeigen, dass eine Splicevariante von fl-CYLD, short CYLD (sCYLD), der Exon 7 und 8 fehlt, natürlicherweise in murinen Zellen vorkommt. Dieser Splicevariante fehlen die Bindungsstellen für die Signalmoleküle TRAF2 und NEMO (Hövelmeyer et al. 2007). Während fl-CYLD nach Bindung an diese Signalmoleküle K63-gebundene Polyubiquitinketten entfernt und somit verhindert, dass TRAF2 und NEMO den IKK-Komplex und somit den NF-κB-Signalweg aktivieren, findet durch die fehlenden Bindungsstellen von sCYLD eine solche Hemmung des NF-κB-Wegs nicht statt.

Mäuse denen fl-CYLD fehlte, die aber die Splicevariante sCYLD exprimierten (Cyld^{ex7/8}), wiesen eine stark erhöhte Anzahl von B-Zellen in allen lymphatischen Organen, einhergehend mit Lymphomegalie und Splenomegalie, auf. Des Weiteren

zeigten B-Zellen dieser Mäuse längere Überlebensraten und produzierten mehr IgG1 (Hövelmeyer et al. 2007). Männliche *Cyld*^{ex7/8} Mäuse waren steril, wiesen einen schlankeren Phänotyp als ihre Wildtyp-Artgenossen auf und konnten Glucose nach Insulin-Injektion schneller metabolisieren (Hövelmeyer 2006).

Studien von Srokowski et al. (2009) zeigten, dass DCs von *Cyld*^{ex7/8} Mäusen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen hyperaktiven Phänotyp besaßen, der verstärkt auf Lipopolysaccharid-Stimulation ansprach. Zudem wiesen die *Cyld*^{ex7/8} Mäuse eine erhöhte T-Zellexpansion auf und konnten durch α -DEC-205-ova induzierte Toleranz unterdrücken. Dies ging mit erhöhter NF- κ B Aktivierung einher.

Urbanik et al. (2012) zeigten, dass Mäuse mit einer leberspezifischen Deletion von *Cyld*^{ex7/8} (*CYLD*^{FF} \times AlbCre), denen fl-CYLD bei Überexpression von sCYLD in Hepatozyten und Cholangiozyten fehlte, eine biliäre Zirrhose entwickelten. Zusätzlich zeigten diese Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für Diethylnitrosamin- und Blei-induzierte hepatozelluläre Karzinome. Dies ging ebenfalls mit erhöhter NF- κ B Aktivierung einher.

1.5 Aufgabenstellung

Die Deubiquitinase CYLD ist ein wichtiger negativer Regulator des NF- κ B-Signalwegs (Kovalenko et al. 2003). Als solcher ist seine bedeutende Rolle bei einer Vielzahl von Karzinomen, in der Regulation des Immunsystems und des Zellzyklus gut untersucht. Die natürlich vorkommende Splicevariante von fl-CYLD, sCYLD, greift aufgrund fehlender Bindungsstellen für TRAF2 und NEMO hingegen nicht inhibierend in den NF- κ B-Signalweg ein. Die hieraus erwachsenden Konsequenzen für Immunantworten sind erst in Ansätzen untersucht worden.

Ziel dieser Arbeit war es, einen tieferen Einblick in die Funktion von sCYLD in Dendritischen Zellen bei Infektionen zu erhalten. Hierzu wurden CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse mit einer selektiven Überexpression von sCYLD bei fehlendem fl-CYLD in Dendritischen Zellen mit *Listeria monocytogenes* infiziert und die sich entwickelnde Immunantwort untersucht.

Es wurden folgende Fragestellungen definiert:

1. Ausmaß des Einflusses einer Überexpression von sCYLD bei fehlendem fl-CYLD in Dendritischen Zellen auf den NF- κ B-Signalweg.
2. Einfluss der sCYLD-abhängigen Regulation des NF- κ B-Signalwegs auf die Funktion Dendritischer Zellen.
3. Untersuchung der sCYLD-abhängigen Interaktion Dendritischer Zellen mit Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zellbiologische Arbeiten

Alle Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen Greiner-Bio-One (Frickenhau-
sen, Deutschland) und Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Hank's BSS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
FKS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Zellkulturmedium	RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), 20 % fetales Kälber Serum (FKS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), 2mM L-Alanin-L-Glutamin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Hybridoma Kulturmedium	DMEM (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), 10 % FKS, 100 U Penicillin / Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
Trypanblau	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
RMA-S Zelllinie	Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Magdeburg, Deutschland
B3Z Hybridoma Zelllinie	Dr. N. Shastri, University of California, Berkeley, USA

2.1.2 Tierexperimentelle Methoden

Isofluran (Forene®)	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
70 µm Sieb	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Erythrozytenlysepuffer	155 mM NH ₄ Cl, 12 mM NaHCO ₃ , und 0,1 mM EDTA

2.1.3 Infektionsbiologische Methoden

<i>Listeria monocytogenes Wildtyp</i>	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Heidelberg Campus Mannheim, Deutschland
<i>Listeria monocytogenes Ovalbumin</i>	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Heidelberg Campus Mannheim, Deutschland
Erythromycin 10 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Herz-Hirn-Bouillon	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Herz-Hirn-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
0,1 % Triton X 100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.4 Molekularbiologische Methoden

EasyDNA Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
1,5 ml/2 ml Eppendorf Gefäß	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol unvergällt (80%, 100%)	Apotheke des Universitätsklinikums Magdeburg, Deutschland
Agarose Gel	1x TBE Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA), 100 µg Ethidiumbromid
10x PCR Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland

dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Cre-Primer sense/antisense	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Hot Star Taq Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland
Aqua dest	Berlin Chemie AG, Berlin, Deutschland

Tabelle 1: Primer für Genotypisierung

Cre sense:	5'- GAACC TGATG GACAT GTTCA GG -3'
Cre anti-sense:	5'- AGTGC GTTCG AACGC TAGAG CCTGT -3'

Tabelle 2: Primer für HPRT- Kontroll-PCR

HPRT sense:	5'-GCT GGT GAA AAG GAC-3'
HPRT antisense:	5'-CCA GTT TCA CTA ATG-3'

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RLT Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
β- Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
QIA Schredder	Qiagen, Hilden, Deutschland
5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DTT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Taqman ® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Taqman ® Gene Expression Assay	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3: Primer für RT-PCR

IFN- γ sense: 5'-TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA-3'

IFN- γ antisense: 5'-TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG-3'

2.1.5 Proteinbiochemische Methoden

2.1.5.1 Isolation von Protein und Absorptionsmessung

Zellysepuffer 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % Triton-X 100, 10 % Glycerol, 10 mM KH_2PO_4 , 0,5 % Desoxycholsäure, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 mM Natriumfluorid, 1 mM Natrium-Molybdat, 1 mM Natriumphosphatpuffer, Aproptinin, Leupeptin, Pepstatin (alle Reagenzien von Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

Bradford Reagenz BioRad, München, Deutschland

2.1.5.2 SDS-PAGE und Westernblot

5x SDS-Puffer Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Proteinmarker Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

SDS-Polyacrylamid-Sammelgel Aq. dest, 5 % Acrylamid 30 %ig (Applichem, Darmstadt, Deutschland), 0,17 M Tris pH 7,4, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (beide Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,1 % Ammoniumpersulfat, 0,1 % TEMED (beide Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

SDS-Polyacrylamid-Trenngel A. dest, 10 % Acrylamid 30 %ig (Applichem, Darmstadt, Deutschland), 0,4 M Tris pH 8,8, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (beide Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,1 % Ammoniumpersulfat, 0,1 % TEMED (beide Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Gellaufpuffer pH 8,3	25 mM Tris, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (beide Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 250 mM Glycin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran Immobilon P	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Filterpapier	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Transferpuffer pH 8,4	25 mM Tris, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (beide Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 500 mM Glycin (Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland), 20 % Methanol (J.T. Baker, Deventer, Niederlande)
Blockierlösung	1,5 g Milchpulver blotting grade (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 150 ml TBS-Tween, 1,5 g BSA
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TBS-Tween 20 pH 7,4	20 mM Tris, 140 mM NaCl (beide Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,1 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
ECL Plus Kit	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
2.1.5.3 Immunpräzipitation	
Sepharose G Beads	GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland
SDS-Probenpuffer	1 g SDS, 2,5 ml 1 M Tris pH 6,8, 4 ml 100 % Glycerin, 2 ml 14,3 M β - Mercaptoethanol

Tabelle 4: Primäre Antikörper für Westernblot und Immunpräzipitation

Antikörper	Blockierungslösung	Verdünnung
Anti-GAPDH (# 5174)	1 % Milchpulver 1 % BSA in TBS-Tween20	1:1000
α -CYLD (# 4495)	1 % Milchpulver 1 % BSA in TBS-Tween20	1:1000
Anti-STAT3-Antikörper (# 9139)	1 % Milchpulver 1 % BSA in TBS-Tween20	1:1000
Anti-Ubiquitin K63 (# 3936)	1 % Milchpulver 5 % BSA in TBS-Tween20	1:1000

Alle Antikörper wurden von Cell Signalling Technology, Danvers, USA, erworben

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper für Westernblot und Immunpräzipitation

Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immuno- globulins/HRP (# P 0399) Dako, Glostrup, Dänemark

Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immu- noglobulins/HRP (# P 0260) Dako, Glostrup, Dänemark

2.1.6 Immunologische Methoden

2.1.6.1 Durchflusszytometrie

FACS Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Puffer	500 ml PBS + 10g BSA
Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ionomycin	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Golgi Plug (+ Brefeldin A)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Listeriolysin (LLO ₁₉₀₋₂₀₁)	JPT, Berlin, Deutschland
MHC-Klasse-Ia SIINFEKL (Ova ₂₅₇₋₂₆₄)	JPT, Berlin, Deutschland

Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Permwash	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Cytofix Puffer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Permeabilisierungspuffer II/III	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Stain Puffer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 6: Antikörper für Fluoreszenzzytometrie

Antikörper	Klon	Detektierter Zelltyp	Firma
Rat Anti-Mouse CD16/32 (Mouse BD Fc Block)	2.4G2	Blockierung unspezifischer Bindungen	BD
V450 Rat Anti-Mouse CD45	30-F11	Leukozyten	BD
FITC Rat Anti-Mouse CD3 Molecular Complex	17A2	T-Zellen	BD
APC Rat Anti-Mouse CD4	RM4-5	CD4 ⁺ T-Zellen	BD
PE Rat Anti-Mouse CD8 α	53-6.7	CD8 ⁺ T-Zellen CD8 α ⁺ DCs	BD
APC Rat Anti-Mouse CD19	1D3	B-Zellen	BD
PE Rat Anti-Mouse CD45R/B220	RA3-6B2	B-Zellen	BD
PE Mouse Anti-Mouse NK 1.1	PK136	NK-Zellen	BD
APC Hamster Anti-Mouse CD11c	HL3	Dendritische Zellen	BD
FITC Rat Anti-Mouse CD 11b	M1/70	CD11b ⁺ DCs	BD
APC Rat Anti-Mouse PDCA1 (CD 317)	927	PDCA1 DCs	BioLegend
PE Rat Anti-Mouse F4/80	6F12	Makrophagen	BD
APC Rat Anti-Mouse CD68 ⁺	FA-11	Makrophagen	BioLegend

FITC Rat Anti-Mouse Ly6-G	1A8	Monozyten Granulozyten	BD
FITC Rat Anti-Mouse Ly6-C	AL-21	Monozyten Granulozyten	BD
PE Rat Anti-Mouse MHC II	M5/114. 15.2	MHC-Klasse-II	eBioscience
PE MHC I (H-2Kb) Rat Anti-Mouse	AF6- 88.5.5.3	MHC-Klasse-I	eBioscience
PE Rat Anti-Mouse CD40	3/23	CD40	BD
PE Hamster Anti-Mouse CD80	16-10A1	CD80	BD
PE Rat Anti-Mouse CD86	GL-1	CD86	BD
PE Rat Anti-Mouse IL-12 (p40/p70)	C15.6	IL-12	BD
PE Rat Anti-Mouse TNF	MP6- XT22	TNF	BD
PE Rat Anti-Mouse IL-6	MP5- 20F3	IL-6	BD
PE Rat Anti-Mouse IL-10	JES5- 16E3	IL-10	BD
PE Rat Anti-Mouse IFN- γ	XMG1.2	IFN- γ	BD
V450 Rat IgG Isotypenkontrolle	A110-1		BD
FITC Rat IgG Isotypenkontrolle	187.1		BD
APC Rat IgG Isotypenkontrolle	B39.4		BD
PE Rat IgG Isotypenkontrolle	A95-1		BD
APC BrdU flowkit			BD
7AAD			BD
CFSE			BD

Antikörper wurden von BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland; eBioscience, San Diego, USA und BioLegend, San Diego, USA bezogen und in den vom Hersteller angegebenen Konzentrationen verwendet.

Tabelle 7: Antikörper und Restimulationsbedingungen für Signalmoleküle

Antikörper	Firma	Restimulation
pERK	BD 612566	50 nM PMA (10 min, 37 °C)
pP38	BD 560406	50 nM PMA, 1µM Ionomycin (10 min, 37 °C)
IkBα	Cell Signaling L35A5	Keine Restimulation

2.1.6.2 MACS

Collagenase D	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
MACS Puffer	0,5 % BSA mit 2 mM EDTA in PBS pH 7,2
Nycodenz 14,5 %	50 ml Aq. dest, 7,25 g Nycodenz (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
LS Magnetsäulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
NK cell isolation kit II, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD11c isolation kit, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.1.6.3 B3Z Hybridoma T-Zell Assay

Chlorphenolrot β-d-Galaktopyranosid	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Nonidet P-40	Calbiochem, San Diego, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Na ₂ EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.7 Software

LabImage ID Software	Kapelan Bio-Imaging Solutions, Leipzig, Deutschland
Flow Jo Software	Flow Jo, LLC Ashland, Oregon, USA
FACS Diva Software	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2.1.8 Geräte

Standard power pack P25	Biometra, Göttingen, Deutschland
Bio Photometer Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Verse	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Gel Logic 100 Imaging System	Kodak, Rochester, USA
Gellaufkammer Biorad mini protein system	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Vortex Genius 3	IKA, Staufen, Deutschland
Schüttelinkubator für Bakterien GFL 3032	GFL, Burgwedel, Deutschland
Hämocytometer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Inkubationsschrank für Bakterien	Memmert, Schwabach, Deutschland
Intas Chemo Cam Luminescent Image Analysis System	INTAS, Göttingen, Deutschland
Light-Cycler 480 II	Roche Diagnostik, Mannheim, Deutschland
MACS Multistand Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Nanodrop 1000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mikroskop Olympus CX-41	Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan
Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipette boy	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Power PAC 200	Bio-Rad, Kalifornien, USA
Semi Dry Blotkammer	Peq lab, Erlangen, Deutschland
Westernblot Rollinkubator Stuart roller mixer SRT 9	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Synergy HT microplate reader	Biotec, Winooski, Vermont, USA
Tenbrook Homogenisatoren	Thermo Scientific, Waltham, USA
Thermo Cycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Mikro 22R	Hettich Lab Technology, Beverly, USA
Zellkulturinkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich Lab Technology, Beverly, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Arbeiten

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer Sterilbank. Die Zellen wurden in Zellkultur Inkubatoren bei 37 °C, 5 % CO₂ und 60 % Wasserdampfsättigung kultiviert. Vor Anwendung des sterilen Mediums erfolgte eine Erwärmung bei 37 °C im Wasserbad.

2.2.2 Tierexperimentelle Methoden

2.2.2.1 Zucht gentechnisch veränderter Mauslinien

Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und vom Landesverwaltungsamt Halle unter dem Aktenzeichen 203.h-42502-2-901 (Universität Magdeburg) genehmigt. Der Schein zur Mitarbeit in Tierexperimenten für Doktoranden wurde an der Medizinischen Fakultät der Universität Magdeburg erlangt.

Für die Experimente wurden C57BL/6 *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und C57BL/6 CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse verwendet, welche von Prof. Ari Waisman, Institut für Molekulare Medizin Mainz, Mainz, Deutschland, zur Verfügung gestellt wurden. C57BL/6 *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse besitzen zwei loxP Bereiche, die Exon 7 flankieren, bei C57BL/6 CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} fehlen Exon 7 und 8 nach Cre-vermittelter Rekombination in CD11c⁺ Zellen (Hövelmeyer et al. 2007; Massoumi et al. 2006).

Die Mäuse wurden unter konventionellen Bedingungen im zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Magdeburg bei einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus sowie Wasser und Futter gehalten. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Experimente sechs bis acht Wochen alt und wurden für die Experimente nach Alter und Geschlecht gruppiert.

2.2.2.2 Organentnahme und Gewinnung einer Einzelzellsuspension

Für die Organentnahme wurden die Tiere durch Inhalation von Isofluran getötet und mit 0,9 % PBS kardial perfundiert um intravasale Leukozyten zu entfernen. Die Organe wurden entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in Hank's BSS (HBSS) mit 3 % FKS auf Eis gelagert.

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die Organe mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein 70 µm Sieb gerieben und in HBSS mit 3 % FKS aufgefangen. Nach Zentrifugation (1200 rpm, 4 °C, 6 min) wurde das Zellpellet mit 5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer für 5 min bei 4 °C behandelt. Es wurde erneut HBSS mit 3 % FKS hinzugefügt und mit o.g. Einstellungen zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 10 ml HBSS mit 3 % FKS resuspendiert. Ein Aliquot dieser Zellsuspension wurde durch Trypanblau im Verhältnis 1:10 angefärbt und die Zellen per Hämocytometer mit einem Lichtmikroskop (Olympus) in zehnfacher Vergrößerung gezählt.

2.2.3 Infektionsbiologische Methoden

2.2.3.1 Anzucht von Listerien und Infektion der Mäuse

Die Infektion der Mäuse erfolgte mit *Listeria monocytogenes* Wildtyp (*Lm*) beziehungsweise mit dem Ovalbumin exprimierenden Stamm *Listeria monocytogenes Ova* (*LmOVA*). Beide Stämme wurden in Herz-Hirn-Boullion angezüchtet und Aliquotes der Kulturen bei -80 °C eingefroren.

Für die Infektion wurden frische Kulturen angesetzt, indem 10 µl des Listerienaliquots zu 10 ml Herz-Hirn-Bouillon hinzugefügt wurden. Den *LmOVA*-Kulturen wurde 5 µg/ml Erythromycin hinzugefügt. Die Kultur wurde für 12 h bei 37 °C im Schüttelinkubator angezchtet. 1 ml dieser Kultur wurde zu 9 ml Herz-Hirn-Bouillon (+/- Erythromycin) hinzugefügt und eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die optische Dichte bei 600 nm gemessen. Als Abgleich diente Herz-Hirn-Bouillon. Die Anzahl der in der Kultur vorhandenen koloniebildenden Einheiten (KBE) wurde anhand einer vorher angefertigten Wachstumskurve bestimmt. Das benötigte Volumen für die gewünschte Infektionsdosis wurde der Kultur entnommen und in steriles, pyrogen freies PBS (pH 7,4) gegeben, sodass das Infektionsvolumen 200 µl betrug. Die Infektion der Mäuse erfolgte intravenös in die Schwanzvene. Zur Überprüfung der Infektionsdosis wurde eine Verdünnungsreihe des Inokulums angefertigt, auf Herz-Hirn-Agar (+/-5 µg/ml Erythromycin) ausplattiert und nach 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C ausgezählt.

2.2.3.2 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

Zur Bestimmung der KBE nach Infektion wurden Leber und Milz entnommen und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 0,1 % Triton X in PBS transferiert. Nach Dissoziation der Organe mit sterilen Tenbrook Homogenisatoren wurde eine zehnfache Verdünnungsreihe der entstandenen Suspension erstellt und je 1 ml jeder Verdünnung auf eine Platte mit Herz-Hirn-Agar gegeben. Nach 24-48 h Inkubation bei 37 °C wurden die KBE unter dem Mikroskop ausgezählt.

Um die KBE in CD8 α ⁺ DCs zu bestimmen wurden Splenozyten von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen 24 h nach Infektion isoliert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD45, CD11c und CD8 α gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit einem FACS Verse in eine CD45⁺ CD11c⁺ CD8 α ⁺ Zellfraktion und eine CD45⁺ Restpopulation gesortet. Die sortierten Zellen wurden in HBSS mit 3 % FKS aufgenommen und gezählt. Nach Zentrifugation (3000 rpm, 4 °C, 6 min) wurden die Zellen in 0,1 % Triton X lysiert und Aliquots der Verdünnungsreihe der Zellsuspension auf Herz-Hirn-Agar ausplattiert. Nach 24-48 h Inkubation bei 37 °C wurden die KBE unter dem Mikroskop gezählt und die Anzahl der Listerien pro Zelle berechnet.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Zur Genotypisierung der Tiere wurde eine Gewebeprobe der Schwanzspitze entnommen und genomische DNA mittels easyDNA Kit isoliert.

Hierzu wurden 320 µl TE Puffer, 20 µl Solution A, 20 µl Solution B und 2,5 µl Protein Degradier zu jeder Gewebeprobe in ein 2 ml Eppendorf Gefäß gegeben. Die Proben wurden durch einen Vortexer gemischt und für 12 h bei 60 °C in einem Schüttelinkubator (Thermomixer) bei 300 rpm inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Solution A und 120 µl Solution B hinzugefügt und die Probe durch einen Vortexer gemischt bis eine einheitliche Viskosität erreicht wurde. Nach Hinzugabe von 750 µl Chloroform wurden die Proben für 10 min bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein steriles 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Nach Hinzugabe von 1 ml 100 % Ethanol (-20 °C) wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 14000 g sowie Anschließend die Zugabe von 500 µl 80 % Ethanol (-20°C) und Vermischung durch mehrmaliges Schwenken. Nach erneuter Zentrifugation mit 14000 g für 5 min wurde der Ethanolüberstand mit einer Pipette entfernt, das Pellet in 45 µl TE Puffer resuspendiert, 1 µl RNase (2 mg/ml) hinzugegeben und die Proben für 30 min bei 37 °C inkubiert.

2.2.4.2 Genotypisierung der Mäuse mittels PCR

Um die Mäuse zu genotypisieren wurde eine Cre-PCR der Schwanz-DNA durchgeführt. Das Cre-Enzym wurde mittels eines Cre-Primers amplifiziert. Nach abgelaufener PCR wurden die Proben auf Agarosegel aufgetragen, elektrisch aufgetrennt (140 V, 20 min) und mittels Gel Logic 100 Imaging System sichtbar gemacht. Erschien eine Bande bei 350 bp auf dem PCR Gel, wurde die Probe als Cre positiv und die Maus somit als CD11c-Cre *Cyld^{ex7/8 fl/fl}* eingestuft.

Pro Ansatz wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

10x Puffer	2,5 µl
MgCl ₂	1,0 µl
dNTPs	0,5 µl
Cre-Primer sense	0,5 µl

Cre-Primer antisense	0,5 µl
Polymerase	0,125 µl
A. dest	18,375 µl
DNA Probe	1,0 µl

Alle Amplifikationen wurden mit folgendem Programm durchgeführt:

95 °C 10 min

95 °C 30 s

60 °C 30 s

72 °C 45 s

72 °C 7 min

4 °C ∞

38 Zyklen

2.2.4.3 Isolation von mRNA aus Gewebe und Generierung von cDNA

Zur Isolation von mRNA wurde den entnommenen Proben 600 µl RLT Puffer mit β -Mercaptoethanol (10 µl/ml) hinzugefügt, das Gewebe mittels Stößel dissoziiert und mittels QIASchredder homogenisiert. Anschließend wurde die mRNA nach Herstelleranweisung mit dem RNeasy Mini Kit extrahiert. Die mRNA Konzentrationen wurde mit Hilfe eines Nanodrop Photometers bestimmt. Die gewünschte mRNA-Menge wurde zu cDNA umgeschrieben indem 2,5 µl Oligo-dT und 4,5 µl dNTPs hinzugefügt und der Ansatz für 5 min auf 65 °C erhitzt wurde. Anschließend wurde den auf Eis gelagerten Proben 16 µl 5x First Strand Buffer, 8 µl DTT (10 mM), 3,5 µl Aq. dest und 1,5 µl Superscript II Reverse Transkriptase hinzugefügt. Die Proben wurden für 50 min bei 42 °C zur cDNA-Synthese inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurde die cDNA 10 min auf 70 °C erhitzt.

Zum Ausschluss einer Kontamination mit genomischer DNA wurde eine HPRT-Gen PCR durchgeführt. Kontaminierte cDNA wurde verworfen.

Folgendes Pipettierschema wurde verwendet:

Aq. dest	19,375 µl
10x Puffer	2,5 µl
dNTPs	0,5 µl
Primer sense	0,5 µl
Primer antisense	0,5 µl
Polymerase	0,125 µl
cDNA	1,5 µl
25 µl Gesamtvolumen	

Die HPRT-Gen PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

	Dauer	Temperatur
1 Aktivierung der Polymerase	10 min	95 °C
2 Denaturierung der DNA	45 Sek.	94 °C
3 Anlagerung der Primer	45 Sek.	52,5 °C
4 Verlängerung der Fragmente	30 Sek.	72 °C
5 Finale Fragmentverlängerung	7 min	72 °C
6 Abkühlung und Aufbewahrung	6 ∞	4 °C

(Schritt 2-4 38 x)

2.2.4.4 RT-PCR

Folgender Ansatz wurde zur Durchführung der RT-PCR verwendet:

Taqman Universal PCR Master Mix	12,5 µl
Taqman Gene Expression Assay	1,0 µl
cDNA	2,5 µl
Aq.dest	9 µl

25 µl Gesamtvolumen

Alle RT-PCRs wurden mit folgendem Programm durchgeführt:

	Dauer	Temperatur
1 Aktivierung der Uracil-N-Glykosylase (UNG)	2 min	50 °C
2 Initiale Denaturierung der cDNA	10 min	95 °C
3 Denaturierung der cDNA	15 s	95 °C
4 Anlagerung der Primer und Fragmentverlängerung	60 s	60 °C
5 Abkühlung und Aufbewahrung	∞	8 °C

(Schritt 3-4 39 x)

Die Auswertung erfolgte mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Livak & Schmittgen 2001).

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Isolation von Protein und Absorptionsmessung

FACS Verse sortierte CD45⁺, CD11c⁺ Zellen und CD45⁺, CD11c⁻ -Zellen wurden für 15 min bei 4 °C mit kaltem Zellysepuffer lysiert. Um feste Zellbestandteile abzutrennen, wurde die Suspension für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen transferiert und der Proteingehalt mit Hilfe des Bradford-Reagenz bestimmt. Hierfür wurde die Bradford Lösung 1:5 mit Aq. dest verdünnt, 200 µl dieser Lösung mit 4 µl der Probe in einem neuen Röhrchen vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei

595 nm in einem Spektralphotometer (Nanodrop) bestimmt. Zellysepuffer diente als Abgleich.

2.2.5.2 SDS-PAGE und Westernblot

Zur Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse wurde eine Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt.

Für die Versuche wurden gleiche Mengen der isolierten Proteine mit 5 x SDS Puffer (mit β -Mercaptoethanol) zur Auftrennung der Primärstruktur vermischt. Zur Auflösung von Sekundär- und Tertiärstrukturen wurden die Proben für 5 min auf 95 °C erhitzt und danach 2 min auf Eis gekühlt. Nach Anzentrifugieren in einer gekühlten Zentrifuge wurden die Proben bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gelagert. Gleiche Mengen an Protein, sowie ein Proteinmarker wurden daraufhin durch SDS-Polyacrylamid-Gele in einer Gellaufkammer nach Hinzugabe eines Gellaufpuffers aufgetrennt.

Die aufgetrennten Proteine wurden von den Gelen mittels einer Semi Dry Blotkammer auf Polyvinylidenfluorid-Membranen transferiert. Hierzu wurden Filterpapiere mit Transferpuffer getränkt und unter die Membran bzw. über das Gel platziert. Nach dem Transfer wurden die Membranen für zwei Stunden bei Raumtemperatur in Blockierungslösung in einem Falcon-Röhrchen auf einem Rotationschüttler inkubiert um unspezifische Bindungen abzusättigen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper (Tabelle 4) für 12 h bei 4 °C.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Membranen dreimal für je 10 min in 0,1 % TBS Tween20 bei Raumtemperatur gewaschen. Es erfolgte die Zugabe des entsprechenden sekundären, peroxidasegekoppelten Antikörpers (Tabelle 5), der 1:1000 mit Blockierungslösung verdünnt wurde sowie eine 60 min Inkubation bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen für 10 min in 0,1 % TBS Tween20 bei Raumtemperatur wurde der Blot mit dem ECL Plus Kit entwickelt. Die durch die Peroxidasereaktion entstandenen Lichtsignale wurden mit dem Intas Chemo Cam Luminescent Image Analysis System sichtbar gemacht und die Proteinintensität densitometrisch mittels der LabImage 1D Software gemessen.

2.2.5.3 Immunpräzipitation

CD45⁺ CD11c⁺ und CD45⁺ CD11c⁻ Zellen wurden mittels Fluoreszenzzytometrie sortiert und analog zum Protokoll 3.2.5.1 lysiert. Die Proben wurden aufgereinigt indem sie bei 4 °C für 30 min mit Sepharose G Beads unter ständigem Schütteln inkubiert wurden. Die Beads wurden durch Zentrifugation (10 000 rpm, 5 sec) entfernt und gleiche Mengen des Lysates für 12 h mit Anti-STAT3 Antikörper bei 4 °C inkubiert. Die entstandenen Immunkomplexe wurden erfasst, indem die Lysate für weitere 12 h bei 4 °C mit Sepharose G Beads inkubiert wurden. Daraufhin wurden die Proben dreimal mit PBS per Zentrifugation (10 000 rpm, 5 sec) gewaschen und der Überstand entfernt. Um die Proteine zu eluieren wurde das Pellet in SDS-Probenpuffer suspendiert und für 5 min auf 100 °C erhitzt. Nach Zentrifugation (10 000 rpm, 5 sec) wurde aus dem Überstand STAT3 und K63-Ubiquitin per SDS-PAGE und Westernblot nachgewiesen.

2.2.6 Immunologische Methoden

2.2.6.1 Durchflusszytometrie

Um die aus den Milzen gewonnenen Leukozyten bezüglich ihrer Subpopulationen näher zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen mit einem FACS Canto II und der FACS Diva 6 Software durchgeführt.

2.2.6.1.1 Extrazelluläre Färbung

Zur Differenzierung verschiedener Zelltypen wurde eine extrazelluläre Färbung von Oberflächenantigenen durchgeführt. Hierfür wurden 10⁶ Zellen in ein FACS-Röhrchen pipettiert und mit 3 ml kaltem FACS Puffer bei 1200 rpm, 4 °C für 6 min gewaschen. Um unspezifische Bindungen bei der späteren Antikörperfärbung abzusättigen, wurde 1 µg CD16/32 Antikörper, verdünnt in 50 µl FACS Puffer, hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 4 °C unter Lichtschutz inkubiert. Daraufhin wurden Färbungen mit den in Tabelle 6 angegebenen, spezifischen Antikörpern durchgeführt. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C unter Lichtschutz wurden die Zellen mit kaltem FACS Puffer mit o.g. Einstellungen gewaschen. Das Pellet wurde in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und die Zellen bis zur Messung bei 4 °C unter Lichtschutz gelagert.

2.2.6.1.2 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen

Um intrazelluläre Färbungen von Zytokinen durchzuführen, wurden Splenozyten mit 50 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin und 1 µl/ml Golgi-Plug (mit Brefeldin A) für 4 h in RPMI bei 37 °C inkubiert. PMA und Ionomycin führen zur Anregung der Zytokinproduktion, während Golgi-Plug den intrazellulären Proteintransport und die Zytokinsekretion blockiert und somit zur Anreicherung von Proteinen im Golgi-Komplex der Zelle führt.

Für die intrazelluläre Färbung von CD4⁺ T-Zellen wurden Splenozyten von *LmOVA*-infizierten Mäusen mit 10⁻⁶ M Listeriolysin (LLO₁₉₀₋₂₀₁) und CD8⁺ T-Zellen mit 10⁻⁸ M MHC-Klasse-Ia-SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) sowie 1 µl/ml Golgi-Plug (mit Brefeldin A) für 6 h restimuliert. Nach zweimaligem Waschen mit 3 ml FACS-Puffer (4 °C) bei 1200 rpm für 6 min, 4 °C wurde 1 µg CD16/32 Antikörper verdünnt in 50 µl FACS Puffer zu dem Zellpellet hinzugegeben, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Der Ansatz wurde für 10 min bei 4 °C unter Lichtschutz inkubiert.

Daraufhin erfolgte die Färbung der extrazellulären Proteine durch Zugabe der spezifischen Antikörper (Tabelle 6) und Inkubation bei 4 °C unter Lichtschutz für 20 min. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen durch Zugabe von 250 µl Cytofix/Cytoperm für 20 min bei 4 °C fixiert und anschließend zweimal mit 1 ml Permwash in einer 1:10-Verdünnung permeabilisiert. Es folgte die intrazelluläre Färbung mit den spezifischen Antikörpern (Tabelle 6) bei 4 °C für 30 min. Nach zwei weiteren Waschsritten mit Permwash wurde das Pellet in FACS Puffer (4 °C) resuspendiert und die Proben bis zur Analyse bei 4 °C unter Lichtschutz gelagert.

Bei allen Experimenten wurden entsprechende Isotypenkontrollen eingesetzt.

2.2.6.1.3 Intrazelluläre Färbung von Signalmolekülen

Für den Nachweis von IκBα wurden Splenozyten nach Protokoll 3.2.5.4.1/2 mit Antikörpern gegen CD45, CD11c und CD8α eingefärbt, fixiert, permeabilisiert und intrazellulär mit IκBα-Antikörper gefärbt.

Zur Anfärbung von p-ERK und p-p38 wurden die Splenozyten zu 2 x 10⁶ Zellen in FACS-Röhrchen aliquotiert. Nach Färben der Zellen mit CD45-, CD11c- und CD8α-Antikörpern für 10 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen wie in Tabelle 7

angegeben stimuliert. Gleichzeitig wurde eine unstimulierte Kontrolle angesetzt. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit Cytofix-Puffer (RT) fixiert (1 ml/ml Zellsuspension) und bei 37 °C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Zellkulturmedium gewaschen (1200 rpm, 6 min, 4 °C), durch Zugabe von 1 ml Perm-Puffer II/III pro 10^6 Zellen permeabilisiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Den Zellen wurden 3 ml Stain-Puffer pro ml verwendetem Perm-Puffer hinzugefügt und die Zellen dreimal gewaschen (o.g. Einstellungen). Daraufhin wurde der entsprechende BD Phosflow-Antikörper hinzugefügt. Nach Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen (1200 rpm, 6 min, 4 °C) und in selbigem resuspendiert. Die Messung erfolgte mittels FACS Canto II sowie die Auswertung mit der Flow Jo Software. Entsprechende Isotypenkontrollen wurden verwendet.

2.2.6.2 MACS-Isolation

Um spezifische Zellpopulationen der aus Organen gewonnenen Zellen für nachfolgende Experimente zu erhalten, wurden MACS-Isolationen durchgeführt. NK-Zellen sowie CD11c⁺ DCs wurden mittels MACS-Isolationskits isoliert. Alle Schritte der Isolation wurden zwischen 2-8 °C durchgeführt, um den Zellstoffwechsel zu blockieren und unspezifische Bindungen zu vermeiden. Um eine große Anzahl von Zellen mit größtmöglicher Reinheit der gewünschten Subpopulation zu erhalten, wurden die zu untersuchenden Milzen mit Collagenase D Lösung (30 mg/ml) desintegriert. Hierfür wurden die Milzen in eine Petrischale mit Collagenase D Lösung eingelegt (5ml/Milz), 500 µl Collagenase D Lösung in jede Milz injiziert und diese mit einer sterilen Schere zerteilt. Nach Inkubation für 30 min bei 37 °C wurden die Milzfragmente mit der Rückseite einer Spritze durch ein 70 µm Zellsieb gerieben und in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Das Volumen wurde mit MACS-Puffer (NK-Zellen) bzw. Zellkulturmedium (DCs) auf 15ml aufgefüllt und die Proben per Zentrifugation gewaschen (1200 rpm, 6 min, 4 °C).

Zur Isolation von NK-Zellen wurde zunächst die Anzahl der Zellen mittels Häemocytometer ausgezählt und die Zellsuspension bei 300 g, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 40 µl MACS Puffer je 10^7 Zellen resuspendiert und 10 µl NK-Zell Biotin Antikörper Cocktail je 10^7 Zellen hinzugefügt. Die Suspension wurde gevortext und für 5 min bei 4 °C inkubiert. Den Zellen wurde 2 ml MACS Puffer je 10^7 Zellen hinzugefügt und die Zellen bei 300 g für 10 min zentrifugiert, der Über-

stand verworfen. Zum Zellpellet wurden 80 µl MACS Puffer sowie 20 µl Anti Biotin Microbeads je 10^7 Zellen pipettiert. Die Zellsuspension wurde gemischt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Die magnetische Separation erfolgte anschließend auf einer LS Säule, welche durch Spülen mit 3 ml MACS Puffer vorbereitet wurde. Die Zellsuspension wurde auf die Säule gegeben und die eluierten, angereicherten NK-Zellen gesammelt. Die Säule wurde dreimal mit je 3 ml MACS Puffer gewaschen und die eluierten Zellen erneut gesammelt. Eine Reinheit der NK-Zellpopulation von 90-95 % wurde mittels FACS Färbung ermittelt.

Zur Isolation von CD11c⁺ DCs wurde vor der magnetischen Auftrennung eine Aufreinigung der Splenozyten mittels Nycodenz-Gradienten durchgeführt. Dies ermöglichte den Erhalt einer höheren Anzahl an vitalen DCs. Das nach Zentrifugation entstandene Pellet wurde zunächst mit Erythrozytenlysepuffer für 10 min bei 4 °C behandelt. Die Zellen wurden dann mit Zellkulturmedium für 6 min bei 1200 rpm, 4 °C gewaschen. Je Milz wurden 2 ml 14,5 % Nycodenz in ein neues Falcon-Röhrchen gegeben und mit 2 ml der Zellsuspension langsam überschichtet. Die Zellen wurden daraufhin bei 530 g, 25 °C für 20 min zentrifugiert. Die obere Schicht wurde abgezogen und verworfen. Die darunterliegenden angereicherten DCs wurden in ein Falcon-Röhrchen übertragen und mit Zellkulturmedium mit o.g. Einstellungen gewaschen. Das Zellpellet wurde in Zellkulturmedium resuspendiert und die Anzahl der Zellen mittels Hämocytometer ausgezählt. Anschließend erfolgte die MACS-Separation der Zellen. Die Zellen wurden zunächst in einem 15 ml Falcon-Röhrchen mit MACS Puffer bei 200 g für 10 min gewaschen. Zu dem Pellet wurden 400 µl MACS Puffer pro 10^8 Zellen hinzugegeben sowie 100 µl der CD11c⁺ Microbeads. Die Suspension wurde gemischt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 2 ml MACS Puffer pro 10^7 Zellen bei 200 g für 10 min gewaschen. Auf das entstandene Pellet wurde pro 10^8 Zellen 500 µl Puffer gegeben. Die magnetische Separation erfolgte auf einer LS Säule. Die Säule wurde dafür in das magnetische Feld des MACS Separators gestellt, durch Spülen mit 3 ml MACS Puffer vorbereitet, die Zellsuspension auf die Säule gegeben und die eluierten Zellen gesammelt. Die Säule wurde dreimal mit je 3 ml MACS Puffer gewaschen und die eluierten Zellen erneut gesammelt. Um die angereicherte CD11c⁺ Zellpopulation zu erhalten, wurde die Säule aus dem magnetischen Feld genommen, auf ein 15 ml Falcon-Röhrchen platziert und 5 ml MACS Puffer auf die Säule pipettiert. Durch Pressen des Stempels wurden die Zellen in dem Falcon-Röhrchen gesammelt. Um

eine höhere Reinheit der Population zu erreichen, wurden die Schritte zur magnetischen Separation erneut durchgeführt. Eine gewünschte Reinheit der CD11c⁺ Zellpopulation von 90-95 % wurde mittels FACS Färbung bestätigt.

2.2.6.3 Ex-vivo NK-Zell Zytotoxizitätsassay

Zur Quantifizierung der Zytotoxizität von NK-Zellen wurden RMA-S Zellen, die eine verringerte Expression von MHC-Klasse-I Antigen aufweisen, mit dem fluoreszierenden Farbstoff Carboxyfluorescein (CFSE) markiert. Teilen sich CFSE markierte Zellen, verringert sich die Menge des Farbstoffes in den Tochterzellen und Zelldivisionen können somit mittels durchflusszytometrischer Messung sichtbar gemacht werden.

Für das Experiment wurden RMA-S Zellen in RPMI Medium entweder mit 5 μ M CFSE (CFSE^{high} Zellen) oder 0,25 μ M CFSE (CFSE^{low} Zellen) markiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen. Die CFSE^{high} und CFSE^{low} Zellen wurden daraufhin in einem Verhältnis von 1:1 mit NK-Zellen inkubiert. Diese wurden zuvor mittels MACS aus den Milzen von *Lm*-infizierten CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen gewonnen. CFSE^{high} Zellen wurden nach 24 h Inkubation mittels FACS quantifiziert.

2.2.6.4 B3Z T-Zell Hybridoma-Assay

Die OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifische B3Z Hybridoma T-Zelllinie enthält das LacZ Gen, welches für das Enzym β -Galaktosidase kodiert. Lac Z wird induziert, sobald der T-Zell Rezeptor das Ova Peptid K^b-SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) erkennt. Die β -Galaktosidase Aktivität des induzierten LacZ Gens kann mittels Hinzugabe des Farbstoffs Chlorophenolrot β -d-Galaktopyranosid gemessen werden.

Die B3Z Zellen wurden uns von Dr. N. Shastri, University of California, Berkeley, USA, zur Verfügung gestellt und in 150 cm³ Zellkulturflaschen in Hybridomamedium angezüchtet. Für das Experiment wurden B3Z T-Zellen (1×10^5 /well) mit MACS-isolierten CD11c⁺ DCs in Mikrotiterplatten inkubiert. Die isolierten DCs wurden 24 h nach Infektion von *LmOVA* infizierten CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen gewonnen. Zu den Proben wurden 0,15 M Chlorophenolrot β -d-Galaktopyranosid, 1 mM MgCl₂ und 0,125% Nonidet P-40 in PBS hinzugegeben und die Zellen bei 37 °C für 6 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von

300 mM Glycin und 15 mM Na₂EDTA beendet und die Absorption bei OD₅₉₅₋₆₆₅ gemessen, um die β -Galaktosidase-Aktivität der B3Z T-Zellen zu bestimmen.

2.2.6.5 BrdU -Assay

Zur Bestimmung der T-Zellproliferation in der Milz von *Lm*-infizierten Mäusen wurde ein BrdU-Assay durchgeführt. BrdU ist ein Nukleotidanalogen, welches anstatt Thymidin während der Synthesephase des Zellzyklus in die DNA eingebaut wird. Das inkorporierte BrdU kann mit spezifischen Antikörpern angefärbt und mittels Durchflusszytometrie gemessen werden. Zusätzlich wurde eine Färbung mit 7AAD durchgeführt, ein Zellfarbstoff, der mit DNA interkaliert und eine Bestimmung des gesamten DNA-Gehalts der Zelle ermöglicht. Durch die Kombination von 7AAD und BrdU, lassen sich Zellen, welche aktiv DNA synthetisieren, nummerieren und entsprechend ihrer Position im Zellzyklus charakterisieren. Für die Experimente wurde den Mäusen an Tag vier und fünf nach Infektion intraperitoneal 1,5 mg BrdU verabreicht. 24 h danach wurden die Mäuse getötet und die BrdU Inkorporation in CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen mittels FACS und dem APC BrdU flowkit gemessen. Hierzu wurden Einzelzellsuspension aus entnommenen Milzen hergestellt, die Zellen extrazellulär mit Antikörpern für CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen angefärbt und dem Herstellerprotokoll folgend mit BrdU Antikörper sowie 7AAD markiert. Nach Resuspension in FACS Puffer wurde die FACS Messung nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Auswertung wurde der Anteil der BrdU-positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl in Prozent angegeben.

2.2.7 Statistische Analyse

Die Daten der Arbeit wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung (SD) angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem students t-test ermittelt. Alle Experimente wurden mindestens zwei Mal durchgeführt und p-Werte von $\leq 0,05$ als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Hochregulation von sCYLD in *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} DCs nach Listerieninfektion

Um die Regulation von sCYLD durch eine Listerieninfektion zu untersuchen, wurde die Expression von sCYLD und fl-CYLD in CD11c⁺ und CD11c⁻ DCs von *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen vor, sowie nach einer Infektion durch Westernblot Analysen überprüft.

In uninfizierten *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen wurde in CD11c⁺ DCs vor allem fl-CYLD exprimiert, während sCYLD nur in geringem Maß vorlag (Abb.6 A). Nach Infektion kam es zu einer Hochregulation von sCYLD, während die Menge an fl-CYLD geringfügig abnahm. Das Verhältnis von sCYLD zu fl-CYLD änderte sich somit von 0,2 vor Infektion auf 0,5 nach Infektion (Abb.6 A).

In CD11c⁺ DCs von uninfizierten und infizierten CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen lag, wie erwartet, kein fl-CYLD vor. sCYLD wurde sowohl vor als auch nach Infektion in CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen in gleichem Maß exprimiert (Abb.6 A). In CD 11c⁻ DCs lag fl-CYLD in normalem Maß vor (Abb.6 B).

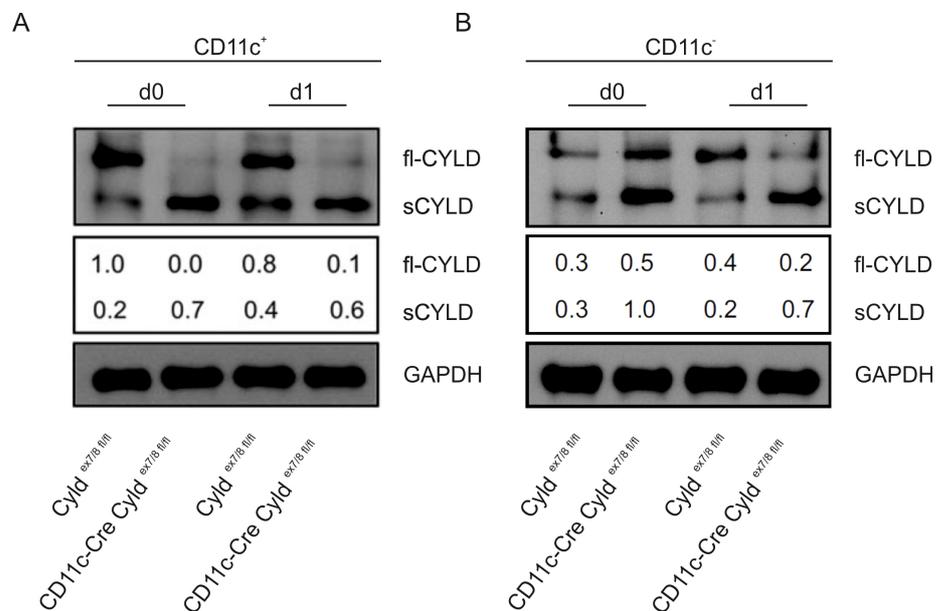


Abb. 6 Westernblotanalyse der sCYLD-Expression bei Listerieninfektion

Cyld^{ex7/8 fl/fl} und CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse wurden i.v. mit 3×10^4 *Lm* infiziert. 24 h nach Infektion wurden fl-CYLD und sCYLD aus FACS sortierten (A) CD45⁺ CD11c⁺ DCs und (B) CD45⁺ CD11c⁻ DCs von uninfizierten und infizierten Mäusen mittels Westernblot analysiert (drei Mäuse pro Gruppe). GAPDH wurde als Kontrolle verwendet. fl-CYLD und sCYLD wurden aus den Westernblot Daten densitometrisch quantifiziert.

3.2 Schutz vor letaler Listerieninfektion durch alleinige sCYLD-Expression in CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} DCs

Um herauszufinden, ob die alleinige Expression von sCYLD einen Einfluss auf den Verlauf einer Listerieninfektion *in vivo* hat, wurden *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse mit einer nicht-letalen Listeriendosis von 3×10^4 *Lm* i.v. infiziert und das Überleben der Tiere bis zum zehnten Tag nach Infektion verfolgt. Sowohl *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} als auch CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse überlebten die Infektion (Abb. 7 A). Bei einer höheren Listeriendosis von 1×10^5 *Lm* waren signifikant bessere Überlebensraten bei CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen zu beobachten. Alle CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse überlebten die Infektion, während 67 % der *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse bis zum sechsten Tag nach Infektion verstarben (Abb. 7 B). Bei Infektion mit einer weiter gesteigerten Listeriendosis von 1×10^6 *Lm* erlagen beide Mausstämmen der Infektion (Abb. 7 C). Die Überexpression von sCYLD führte somit abhängig von der Listeriendosis zu einem Überlebensvorteil der CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse.

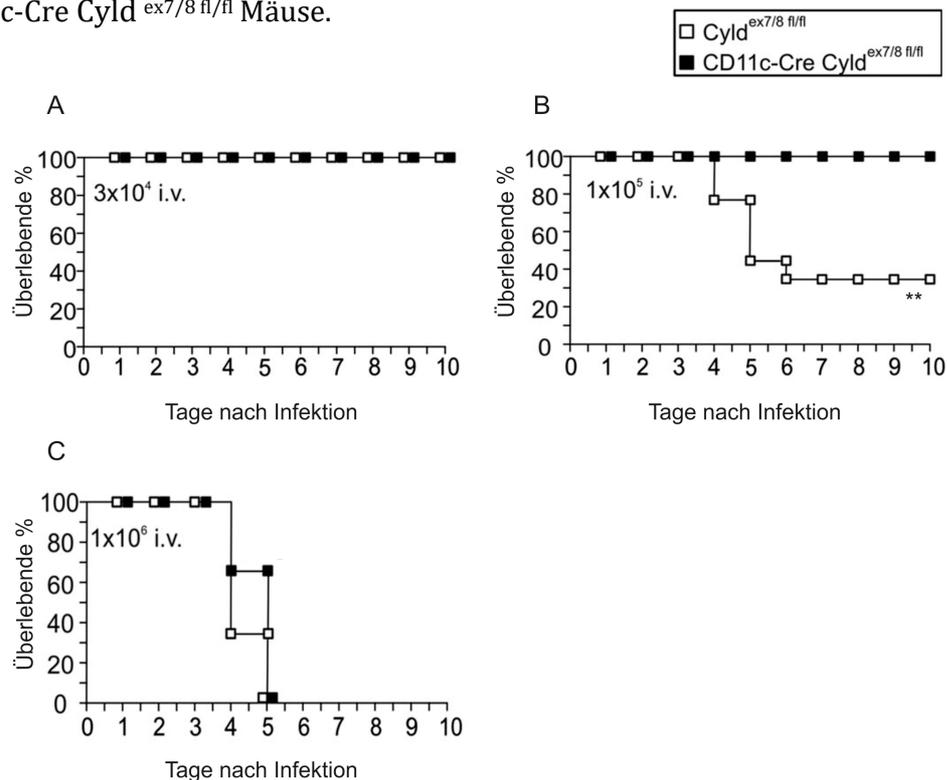


Abb. 7 Höhere Überlebensraten bei CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen nach Listerieninfektion

Cyld^{ex7/8 fl/fl} und CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse wurden mit (A) 3×10^4 , (B) 1×10^5 , (C) 1×10^6 *Lm* i.v. infiziert. Überlebensraten wurden bis Tag zehn nach Infektion beobachtet (A, B). In (A) ist eins von drei Experimenten in (B, C) eins von zwei unabhängigen Experimenten mit je neun Mäusen dargestellt. (** $p < 0,005$, t-test).

3.3 Verbesserte Pathogenkontrolle bei CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen

Um zu klären, ob sCYLD zusätzlich zum Einfluss auf die Überlebensrate auch zu einer verringerten Pathogenlast in den Organen der CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse führt, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Listerieninfektion Organe zur Ermittlung der koloniebildenden Einheiten (KBE) entnommen. Bei einer Dosis von 3×10^4 *Lm* i.v. (Abb.8 A-D), sowie bei erhöhter Dosis von 1×10^5 *Lm* (Abb.8 E-H) war die Bakterienlast in Milz, Leber und Lunge von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen verglichen mit *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen signifikant geringer. Bei einer noch höheren Dosis von 1×10^6 *Lm* (Abb.8 I-L) zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied.

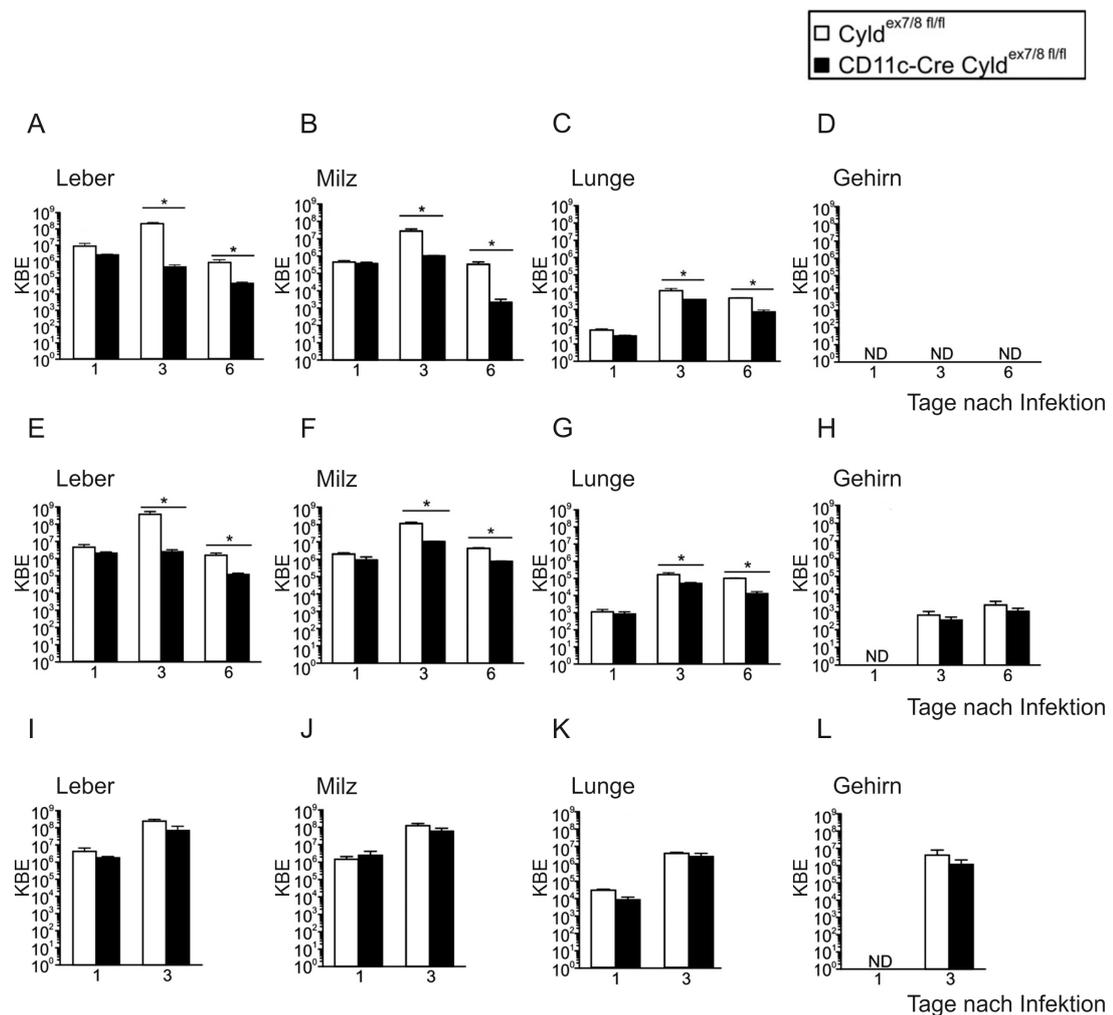


Abb. 8 Bessere Pathogenkontrolle bei CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen nach Listerieninfektion

Cyld^{ex7/8 fl/fl} und CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse wurden mit 3×10^4 (A-D), 1×10^5 (E-H), 1×10^6 (I-L) *Lm* i.v. infiziert. KBE wurden in Leber (A, E, I), Milz (B, F, J), Lunge (C, G, K) und Gehirn (D, H, L) zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion gemessen (* $p < 0,05$, t-test). Daten sind als Mittelwert \pm SD von neun Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt. ND = nicht nachweisbar.

3.4 Unveränderte Listerieninvasion in CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} DCs

Um herauszufinden, ob die Ursache für die verbesserte Pathogenkontrolle und das verlängerte Überleben an einer bereits zu Beginn des Infektionsgeschehens geringeren Pathogenanzahl in CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen lag, wurde das Eintritts- und Verbreitungsverhalten von Listerien in den Mausorganismus untersucht. Da CD8 α ⁺ DCs die entscheidende zelluläre Eintrittsstelle für Listerien in die Milz darstellen, wurde nach Listerieninfektion diese Zellpopulation durch FACS aus der Milz isoliert und ermittelt, ob sich die Listerienanzahl zwischen *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen unterschied. Die Anzahl der Listerien in CD8 α ⁺ DCs war jedoch in beiden Mausstämmen gleich (Abb.9 A, B). Dies galt auch für die Listerienanzahl in den übrigen CD45⁺ Zellen.

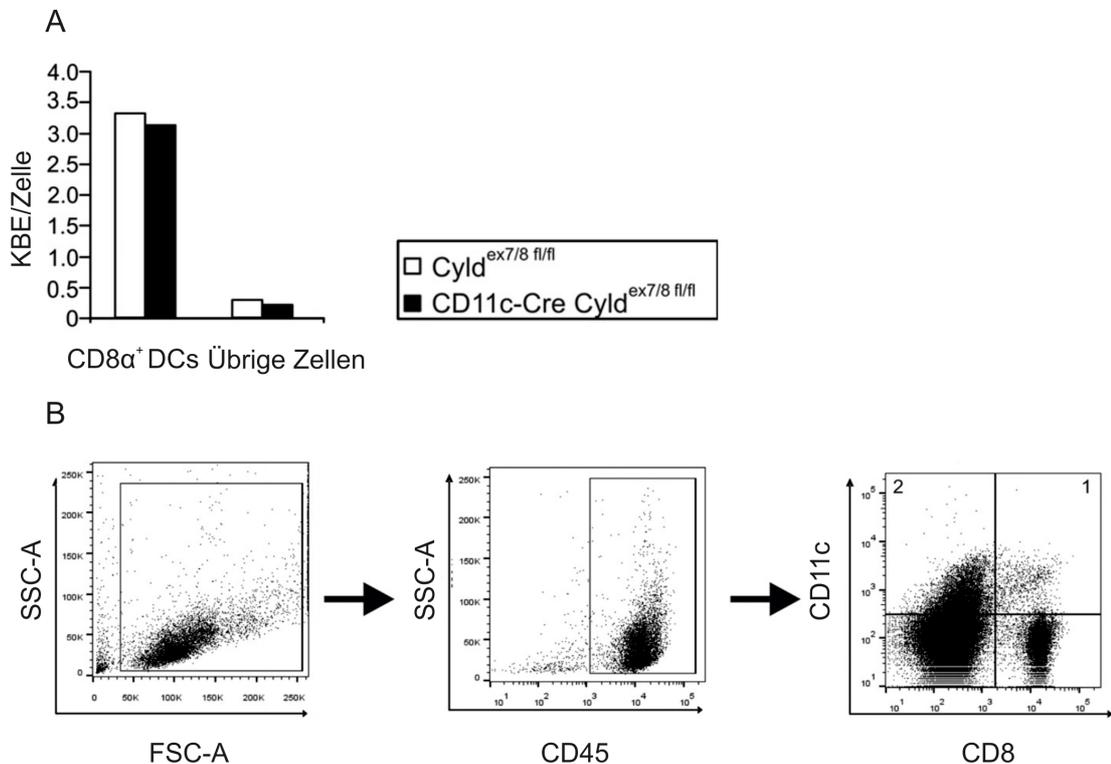


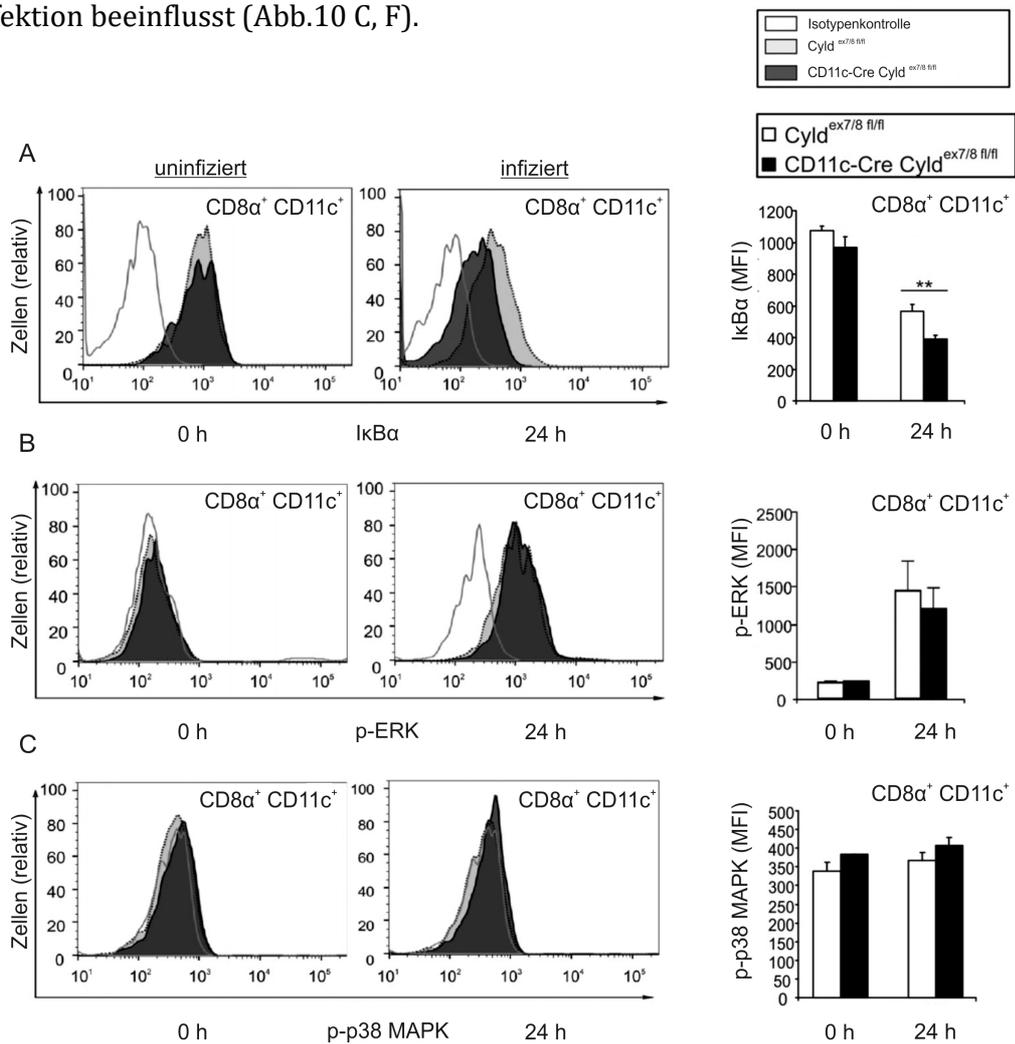
Abb. 9 Ähnliche Listerienzahl in DCs von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen

(A) *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse wurden mit 3×10^4 *Lm* infiziert. 16 h nach Infektion wurden Zellen per FACS sortiert, die Zellen gepoolt und die KBE in CD8 α ⁺ DCs und übrigen Leukozyten bestimmt. Fünf Mäuse je Gruppe wurden untersucht. (B) Gating-Strategie zur Identifizierung und Isolation von CD45⁺ CD11c⁺ CD8 α ⁺ DCs. Eins von zwei unabhängigen Experimenten mit je fünf Mäusen ist dargestellt.

3.5 Erhöhte NF-κB-Aktivierung in CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} DCs

Da die Infektion der CD8α⁺ DCs durch *L. monocytogenes* in beiden Mausgruppen gleich war, wurde überprüft, ob sich die Zellantwort auf das Pathogen zwischen *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen unterschied. Hierzu wurden Mäuse beider Gruppen mit 3 x 10⁴ *Lm* infiziert, zu angegebenen Zeitpunkten die Milzen entnommen und in hieraus aufbereiteten Zellen die Expression der Signalwege NF-κB, ERK und p38 in DCs durch intrazelluläre Fluoreszenzzytometrie gemessen (Abb.10 A-F).

IκBα, ein inhibitorisches Signalmolekül des kanonischen NF-κB Wegs, war nach Listerieninfektion von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen sowohl in CD8α⁺ DCs (Abb. 10 A) als auch in CD8α⁻ DCs (Abb. 10 D) stärker reduziert als in *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen. Somit zeigte sich bei CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen eine verstärkte Aktivierung des kanonischen NF-κB Wegs. Die Aktivierung von ERK war in CD8α⁺/CD8α⁻ DCs beider Mausgruppen gleichermaßen ausgeprägt (Abb.10 B, E). Die p38-Phosphorylierung wurde zu den gemessenen Zeitpunkten nicht von einer Infektion beeinflusst (Abb.10 C, F).



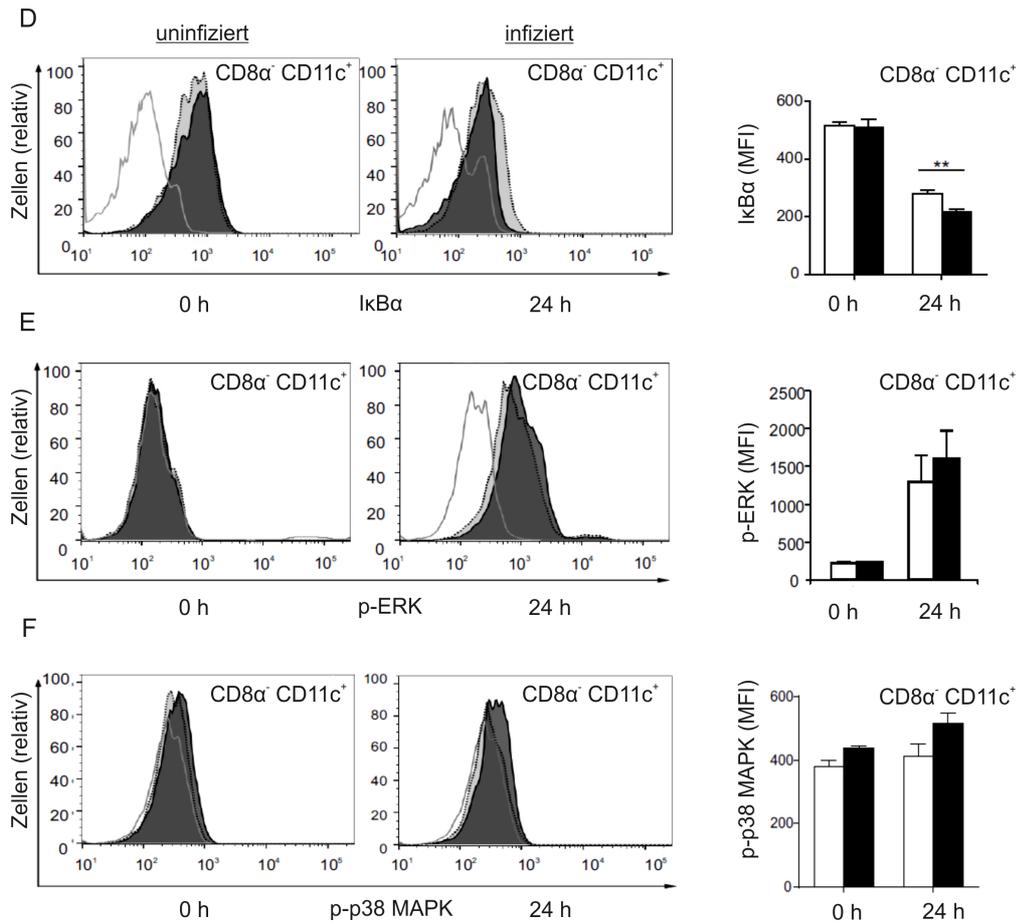


Abb. 10 sCYLD-Überexpression führt zu einer verstärkten Aktivierung des NF- κ B-Wegs

Cyld^{ex7/8 fl/fl} und CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäuse wurden mit 3×10^4 *Lm* infiziert. Signalmoleküle wurden zu angegebenen Zeitpunkten durch Fluoreszenzzytometrie gemessen und sind als Histogramme sowie als MFI in Balkendiagrammen dargestellt (A-F). Isotypenkontrollen sind als offene Histogramme dargestellt. Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäuse sind in Hellgrau, CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäuse in Dunkelgrau dargestellt. Repäsentative Daten individueller Mäuse von einem aus zwei Experimenten, welche jeweils mit fünf Mäusen pro Gruppe durchgeführt wurden, sind dargestellt. MFI werden als Mittelwert \pm SD von fünf Mäusen aus einem Experiment, repräsentativ für zwei Experimente dargestellt (** $p < 0,01$, t-test).

3.6 Induktion einer sCYLD unabhängigen K63-Ubiquitinierung von STAT3 in DCs durch *Listeria monocytogenes*

STAT3 ist ein weiteres Signalmolekül, welches in Signalwege eingebunden ist, die im Verlauf einer Listerieninfektion aktiviert werden. Da eine K63-Deubiquitinierung von STAT3 durch fl-CYLD bekannt ist, war es von Interesse, ob STAT3 auch einer Regulation durch sCYLD unterlag und ob es bezüglich dieses Signalwegs Unterschiede zwischen Cyld^{ex7/8 fl/fl} und CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen gab.

Um eine mögliche Regulation näher zu analysieren, wurde STAT3 aus CD11c⁺ DCs von infizierten und uninfizierten *Cyld*^{ex7/8 fl/fl}, CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und *CYLD*^{-/-} (-fl-CYLD/-sCYLD) Mäusen immunpräzipitiert und die K63-Ubiquitinierung durch Westernblot analysiert. Nach Infektion war die Menge an K63-polyubiquitiniertem STAT3 Protein im *CYLD*^{-/-} Mausstamm erhöht. Die *CYLD*^{ex7/8 fl/fl} und CD11c-Cre *CYLD*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse zeigten hingegen gleichermaßen reduzierte Mengen an K63-polyubiquitinierten STAT3 (Abb.11).

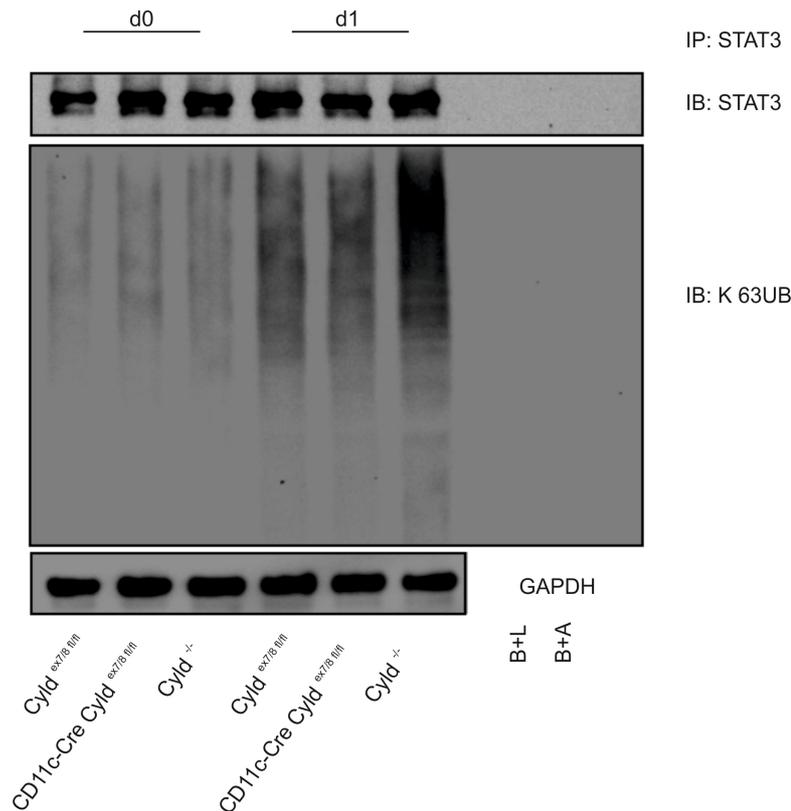


Abb. 11 Ubiquitinierung von STAT3 ist sCYLD unabhängig

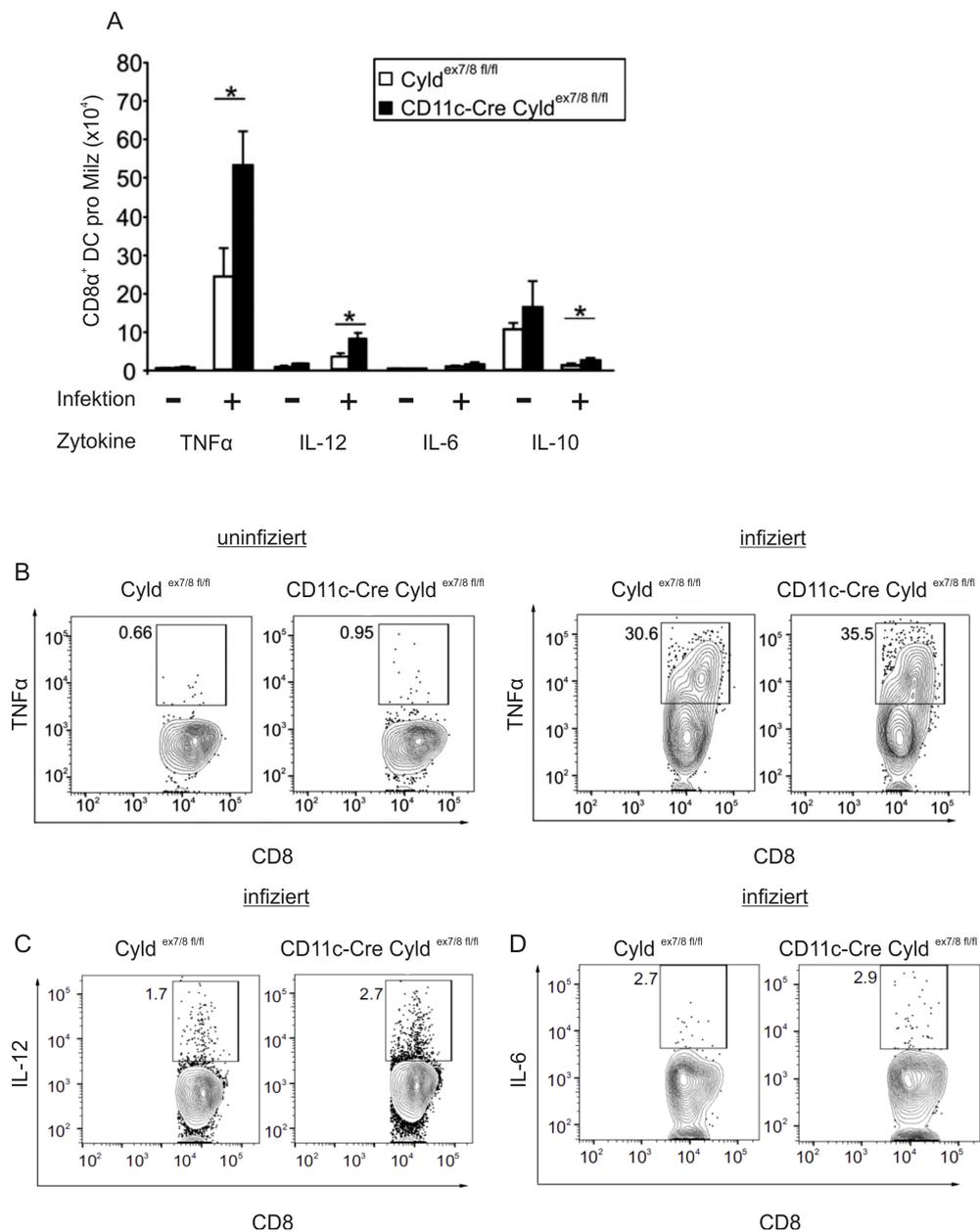
Proteinlysate von uninfizierten und 3×10^4 *Lm*-infizierten CD11c⁺ DCs von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl}, *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und *Cyld*^{-/-} Mäusen wurden mit STAT3 immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden für K63-Ubiquitin und GAPDH gefärbt. Als Kontrolle wurden Beads plus Lysate (B+L) und Beads plus STAT3-Antikörper (B+A) verwendet.

3.7 Erhöhte Zytokinproduktion durch CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} CD8 α ⁺ DCs

Der NF- κ B-Weg reguliert unter anderem die Zytokinproduktion von Zellen. Zytokine ermöglichen eine Zell-Zell-Kommunikation und somit die Koordination des Immunsystems bei Infektionen. Um den Einfluss des stärker aktivierten NF- κ B-Wegs in CD8 α ⁺ DCs von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen auf die Zytokinproduktion zu analysieren, wurden CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse mit 3×10^4 *Lm*

iniziert, Zellen aus entnommenen Milzen isoliert und die intrazelluläre Expression von TNF- α , IL-6, IL-12 und IL-10 mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

Während CD8 α^+ DCs in uninzierten Mäusen nur sehr geringe Mengen dieser Zytokine produzierten, führte eine Infektion zum Anstieg der gemessenen Zytokine in beiden Mausgruppen. In CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen war der prozentuale sowie absolute Anstieg von TNF- α , IL-12, und IL-10 produzierenden CD8 α^+ DCs jedoch signifikant höher (Abb. 12 A-D). Zudem wurden an Tag drei nach Infektion in einem weiteren Experiment Milzen entnommen und die Expression von IFN- γ durch semiquantitative RT-PCR bestimmt. Hier zeigte sich in den entnommenen Milzen von CD11c-Cre Cyld^{ex7/8} Mäusen eine signifikante Hochregulation dieses Zytokins (Abb. 12 E).



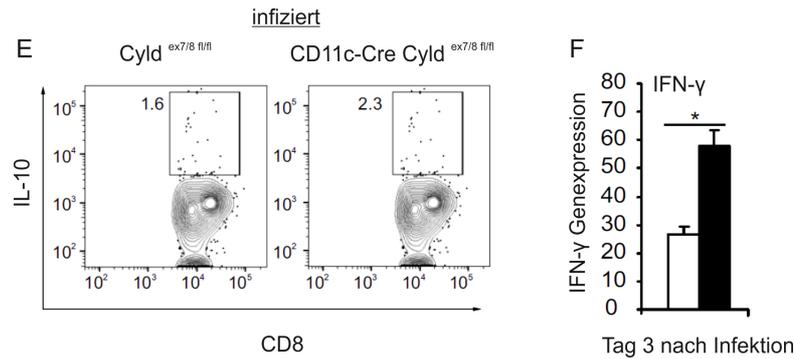


Abb. 12 Erhöhte Zytokinproduktion durch CD8 α^+ DCs von CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen

Cyld^{ex7/8 fl/fl} und CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäuse wurden mit 3×10^4 *Lm* infiziert. (A-E) Zytokine wurden 24 h nach Infektion durch Fluoreszenzzytometrie gemessen. (A) Absolute Zahlen zytokinproduzierender CD8 α^+ DCs vor und nach Infektion von Cyld^{ex7/8 fl/fl} und CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen. Angabe als Mittelwert \pm SD von sechs Mäusen pro Gruppe. Das gezeigte Experiment ist repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente (* $p < 0,05$ t-test). (B-E) Dot-Plots zytokinproduzierender CD8 α^+ DCs. Repräsentative Daten von einer von sechs Mäusen pro Gruppe. (F) Hochregulation von IFN- γ in Milzen von CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen. Die Ermittlung erfolgte durch RT-PCR und semiquantitative Analyse. mRNA-Expression wird als x-facher Anstieg im Vergleich zur naiven Kontrolle dargestellt. Angabe als Mittelwert \pm SD von drei Mäusen pro Gruppe (* $p < 0,05$ t-test).

3.8 Erhöhte Leukozytenzahlen in der Milz von CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen

Bei der Organentnahme für Experimente fiel wiederholt auf, dass die Milzen von CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen ein größeres Volumen als die der Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäuse aufwiesen (Abb.13 A). Weiterhin ergaben Zählungen der Leukozyten höhere Zellzahlen (Abb.13 B). Es stellte sich die Frage, ob sich auch die Zahl einzelner Leukozytensubpopulationen unterschied. Um dies näher zu untersuchen, wurden CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} und Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäuse i.v. mit 3×10^4 *Lm* infiziert und mittels Fluoreszenzzytometrie die Leukozyten-Subpopulationen ermittelt.

Analog zu der Gesamtzellzahl war die Zahl CD11c⁺ DCs, CD8 α^+ DCs sowie CD8⁺ T-Zellen nach Infektion in CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen im Vergleich zu Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen erhöht (Abb.13 C, D). In nicht infizierten CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} und Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen lagen gleiche Anzahlen von B-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen, Monozyten und Granulozyten und DCs vor.

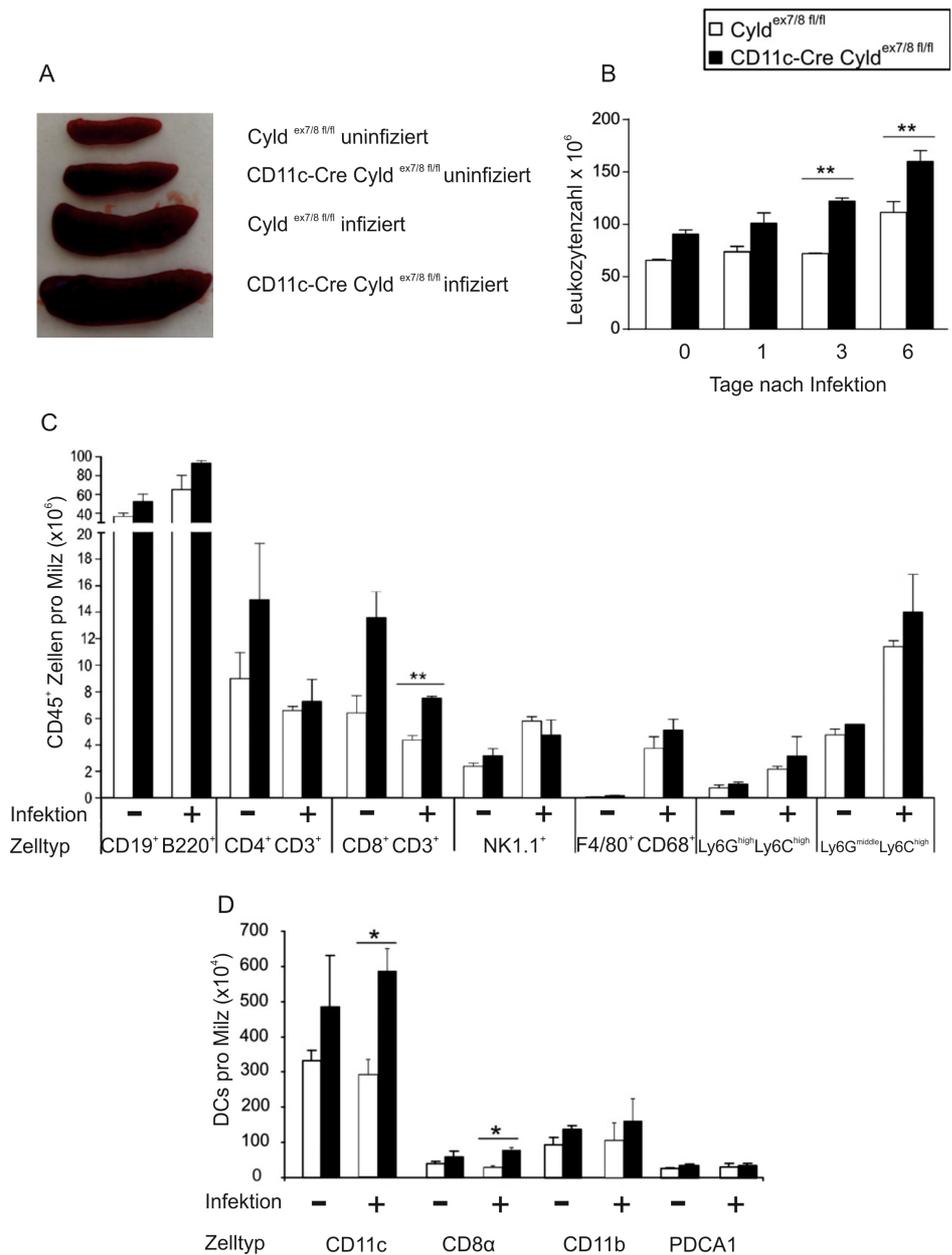


Abb. 13 Erhöhte Leukozytenzahlen und größeres Organvolumen bei CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen

CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} und Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäuse wurden mit 3×10^4 *Lm* infiziert. (A) Organvolumen der Milz von CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} und Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen an Tag drei nach Infektion. (B) Gesamtanzahl der Leukozyten in *Lm*-infizierten CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} und Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen an Tag null, eins, drei, sechs nach Infektion. Daten werden als Mittelwert +/- SD von fünf Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt von einem Experiment repräsentativ für zwei Experimente dargestellt (**p < 0,01, t-test). (C, D) Durch Fluoreszenzzytometrie gemessene absolute Anzahl von B-Zellen (CD19⁺ B220⁺), CD4⁺ T-Zellen (CD3⁺ CD4⁺), CD8⁺ T-Zellen (CD3⁺ CD8⁺), NK-Zellen (NK1.1⁺ CD3⁻), Makrophagen (CD68⁺ F4/80), Granulozyten (Ly6G^{high} Ly6c^{high}), inflammatorische Monozyten (Ly6G^{middle} Ly6c^{high}), CD11c⁺ DCs, konventionelle DCs (CD11c⁺ CD11b⁺ CD8 α ⁻), CD11c⁺ CD11b⁻ CD8 α ⁺ DCs und plasmazytoide DCs (CD11c^{low} PDCA1⁺) aus Milzen von CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} und Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen vor und nach Infektion (Tag drei). Daten werden als Mittelwert +/- SD von sechs Mäusen pro Gruppe von einem Experiment repräsentativ für zwei Experimente dargestellt (*p < 0,05, t-test).

3.9 Verstärkte MHC-Klasse-II Expression in CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} DCs

DCs sind wichtige Antigenpräsentierende Zellen, die zusätzlich zur Produktion von Zytokinen, Oberflächenmoleküle exprimieren, welche eine Kommunikation mit anderen Zellpopulationen ermöglichen. Um zu überprüfen, ob DCs von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen ein verbessertes Antigenpräsentationsvermögen besitzen, wurde nach Listerieninfektion die Expression der Oberflächenmoleküle MHC-Klasse-II, MHC-Klasse-I, CD40, CD80 und CD86 mittels Fluoreszenzzytometrie gemessen.

Sowohl CD11c⁺ DCs als auch CD8 α ⁺ DCs von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen exprimieren nach Infektion mehr MHC-Klasse-II Antigene als *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse, während die Expression der anderen gemessenen Oberflächenantigene sich zwischen beiden Mausgruppen nicht unterschied (Abb.15).

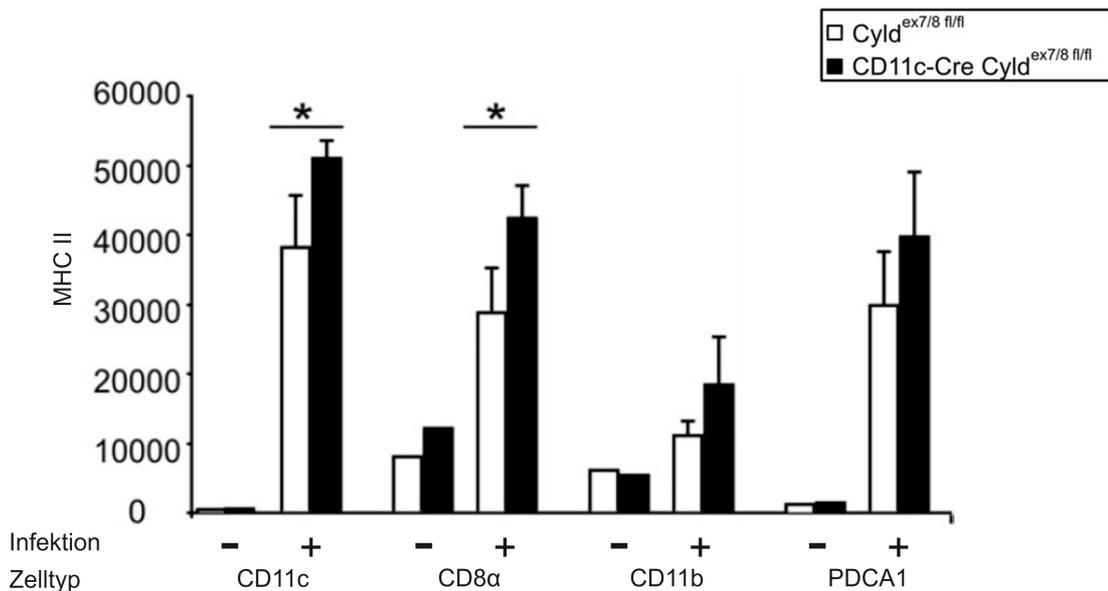


Abb. 14 MHC-Klasse-II Expression in Dendritischen Zellen von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen

CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen wurden mit 3×10^4 *Lm* infiziert. An Tag drei wurde die MFI von MHC-Klasse-I, MHC-Klasse-II, CD40, CD80 und CD86 durch Fluoreszenzzytometrie von DCs der Milz von uninfizierten und infizierten Mäusen bestimmt. Daten werden als Mittelwert \pm SD von sechs Mäusen eines Experiments repräsentativ für zwei Experimente dargestellt (* $p < 0,05$, t-test).

3.10 Verstärkte Aktivierung von NK-Zellen durch CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} DCs

Da die zuvor durchgeführten Experimente zeigten, dass $CD8\alpha^+$ DCs von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen sowohl ein verbessertes Antigenpräsentationsvermögen als auch eine erhöhte Zytokinproduktion aufwiesen, stellte sich die Frage nach dessen Auswirkung auf andere Zelltypen. Um zu analysieren, in welchem Ausmaß NK-Zellen, die wesentlich durch DCs aktiviert werden, durch diese Mechanismen beeinflusst wurden, wurde deren Aktivierung nach Infektion durch intrazelluläre IFN- γ -Färbung und durchflusszytometrische Messung untersucht.

Sowohl die prozentuale als auch die absolute Anzahl IFN- γ produzierender NK-Zellen war in CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen verglichen mit *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen signifikant erhöht (Abb. 15 A, B).

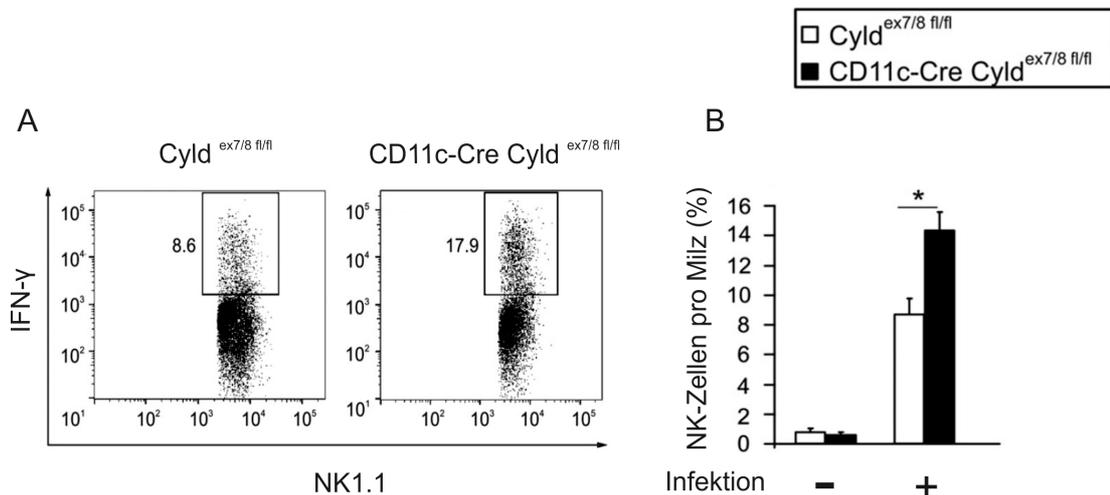


Abb. 15 NK-Zellen von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen produzieren mehr IFN- γ

CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse wurden mit 3×10^4 *Lm* infiziert. (A, B) An Tag drei nach Infektion wurde die Prozentzahl IFN- γ produzierender NK-Zellen durch Fluoreszenzzytometrie ermittelt. (A) Representative Daten von einer von sechs Mäusen pro Gruppe. (B) Daten gezeigt als Mittelwert \pm SD von sechs Mäusen pro Gruppe von einem Experiment, repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente (* $p < 0,05$, t-test).

3.11 Erhöhte Zytotoxizität von CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} NK-Zellen

Um zu untersuchen, ob NK-Zellen von CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen zusätzlich zu ihrer vermehrten IFN- γ Produktion auch eine erhöhte Zytotoxizität aufwiesen, wurde ein Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Hierzu wurden NK-Zellen von infizierten Mäusen isoliert und mit CFSE-gelabelten RMA-S Zellen (TAP-2 defiziente Zellen, mit einem Defekt der MHC-Klasse-I Antigenpräsentation) koinkubiert.

NK-Zellen aus infizierten CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen konnten CFSE^{high} gelabelte RMA-S Zellen signifikant besser abtöten als NK-Zellen von Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen (Abb. 16).

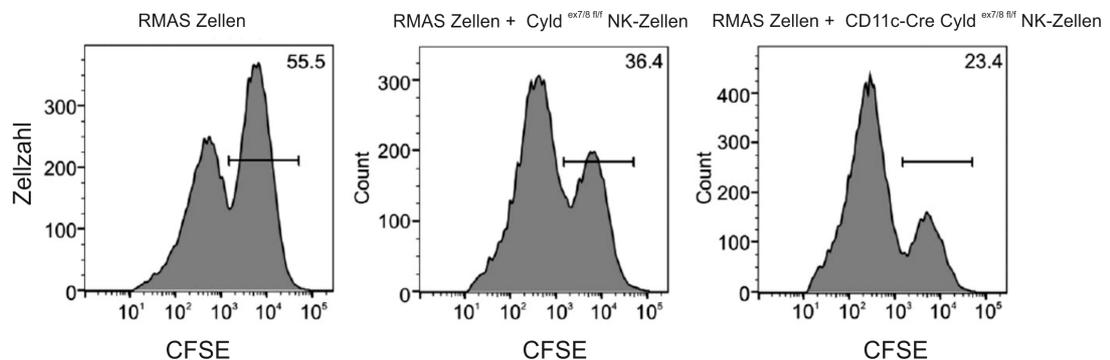


Abb. 16 Durchflusszytometrische Analyse der NK-Zell Zytotoxizität

MACS isolierte NK-Zellen von 3×10^4 *Lm* infizierten CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} und Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen wurden an Tag drei nach Infektion mit CFSE-gelabelten RMA-S Zellen koinkubiert. Die Zytotoxizität der NK-Zellen wurden nach 18 h durch fluoreszenzzytometrische Analyse des aufgenommenen CFSE Farbstoffs gemessen (* $p < 0,05$, t-test). Daten von einem aus zwei unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

3.12 Verbesserte MHC-Klasse-I Antigenpräsentation durch CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} DCs

Um zu untersuchen, ob die Hochregulation von sCYLD in DCs von CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen neben NK-Zellantworten auch listerienspezifische CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellantworten beeinflusst, wurde die Zahl IFN- γ produzierender, listerienspezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bestimmt. Hierzu wurden CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} und Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäuse mit Ovalbumin-transgenen Listerien (*LmOVA*) infiziert, T-Zellen aus den Milzen beider Mausstämmen isoliert und entweder mit MHC-Klasse-I spezifischem SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) Peptid oder MHC-Klasse-II-spezifischem Listeriolysin (LLO₁₉₀₋₂₀₁) Peptid stimuliert.

Anschließend wurde die Anzahl IFN- γ produzierender CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen durch Durchflusszytometrie ermittelt.

Sowohl in CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} als auch in *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen waren nach Infektion IFN- γ produzierende listerienspezifische CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen nachweisbar. Die Anzahl dieser Zellen war jedoch in CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen signifikant höher (Abb.17 A,B).

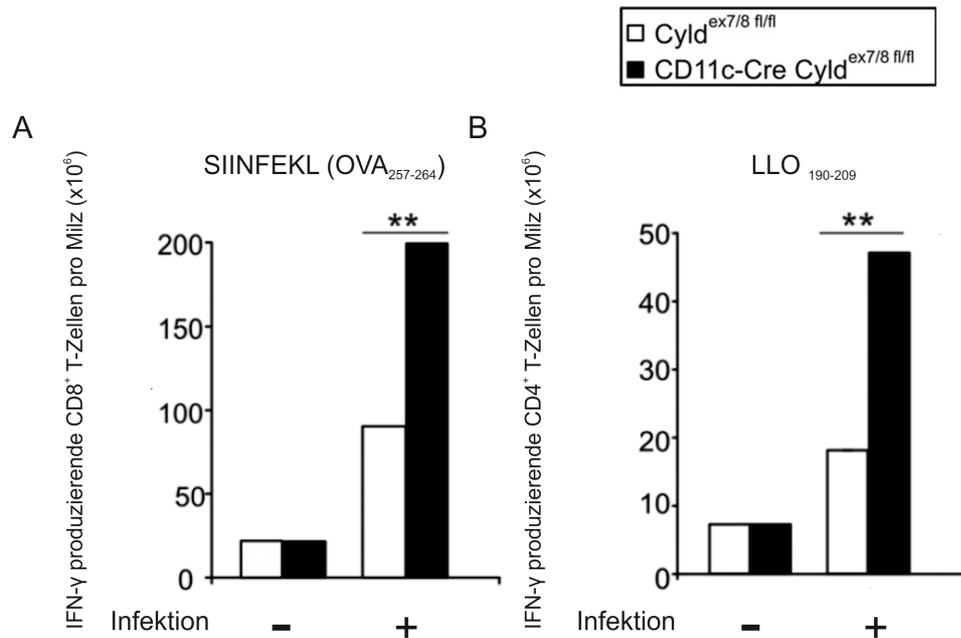


Abb. 17 Durchflusszytometrische Analyse listerienspezifischer CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen

Splenozyten wurden an Tag sieben nach Infektion mit 1×10^5 *LmOVA* isoliert und mit (A) OVA₂₅₇₋₂₆₄ und (B) LLO₁₉₀₋₂₀₁ Peptiden stimuliert. Die Frequenzen gesamt- und listerienspezifischer, IFN- γ produzierender (A) CD8⁺ und (B) CD4⁺ T-Zellen wurden durch Fluoreszenzzytometrie ermittelt. Daten werden als Mittelwert +/- SD von sechs Mäusen pro Gruppe aus einem Experiment repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente dargestellt (**p < 0,01, t-test).

3.13 Verbessertes CD8⁺ T-Zell Priming durch CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} DCs

Um zu analysieren, ob eine verbesserte MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} DCs mit der erhöhten Zahl listerienspezifischer CD8⁺ T-Zellen in den Mäusen korrelierte, wurde die T-Zell-Stimulation durch DCs mittels eines *ex vivo* Antigen-Präsentations-Assay gemessen. DCs aus CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen wurden hierfür mit LacZ-induzierbaren B3Z Reporter T-Zell-Hybriden inkubiert, welche nach Aktivierung ihre β -Galaktosidase-Expression hochregulieren.

Die β -Galaktosidase-Expression in $CD8^+$ T-Zellen, welche durch DCs aus $CD11c$ -Cre $Cyld^{ex7/8 fl/fl}$ Mäusen aktiviert wurden, war signifikant höher, als in den von $Cyld^{ex7/8 fl/fl}$ DCs aktivierten $CD8^+$ T-Zellen (Abb.18).

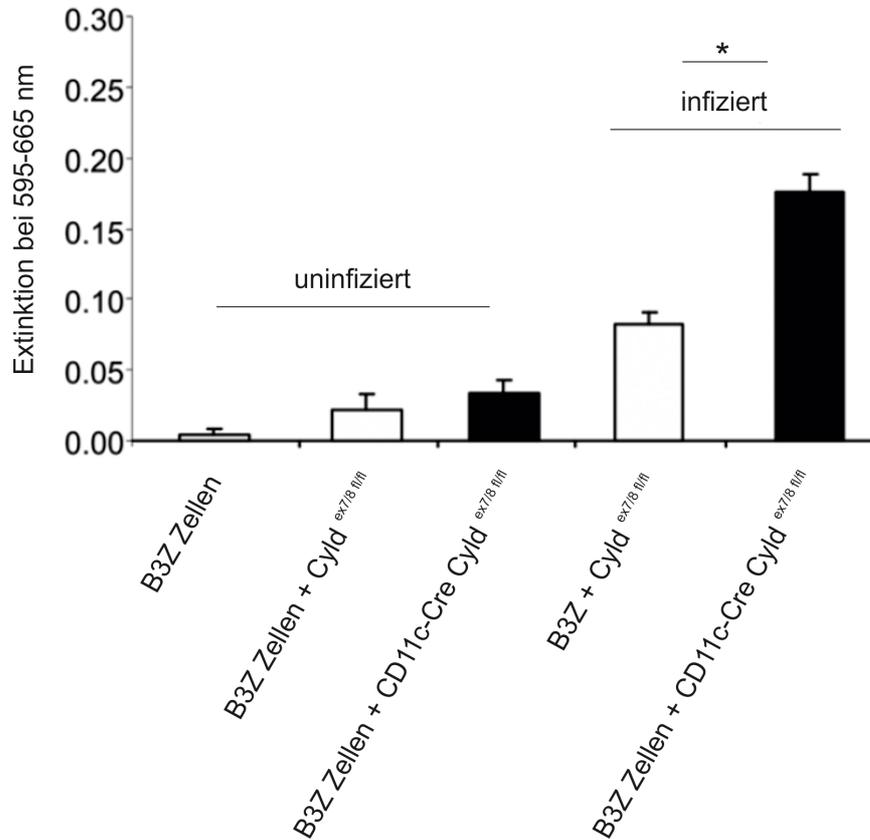


Abb. 18 Ex vivo Antigen-Presentations-Assay

$CD11c^+$ DCs wurden mittels MACS aus Mäusen von *LmOVA*-infizierten $CD11c$ -Cre $Cyld^{ex7/8 fl/fl}$ und $Cyld^{ex7/8 fl/fl}$ Mäusen 24 h nach Infektion isoliert. DCs von fünf Mäusen pro Gruppe wurden mit B3Z T-Zellen für 6 h kokultiviert. Die Extinktion wurde bei 595 nm gemessen und die gemessenen Werte von der Extinktion bei 665 nm subtrahiert, nachdem β -Galaktosidase Substrat CPRG hinzugefügt wurde. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SD von DCs aus fünf Mäusen pro Gruppe. Ein Experiment steht repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente (* $p < 0,05$, t-test).

3.14 Erhöhte $CD8^+$ T-Zellproliferation in $CD11c$ -Cre $Cyld^{ex7/8 fl/fl}$ Mäusen

Um zu klären, ob sCYLD neben einem verbesserten T-Zell Priming auch einen Einfluss auf die T-Zellproliferation hatte, wurde ein BrdU-Assay durchgeführt. Hierzu wurde infizierten $CD11c$ -Cre $Cyld^{ex7/8 fl/fl}$ und $Cyld^{ex7/8 fl/fl}$ Mäusen BrdU verabreicht und dessen Inkorporation in $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch ermittelt.

CD8⁺ T-Zellen von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen inkorporierten mehr als dreimal so viel BrdU wie CD8⁺ T-Zellen der *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse (Abb.19 A, C). CD4⁺ T-Zellen von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen inkorporierten hingegen nur geringfügig mehr BrdU (Abb.19 B, C).

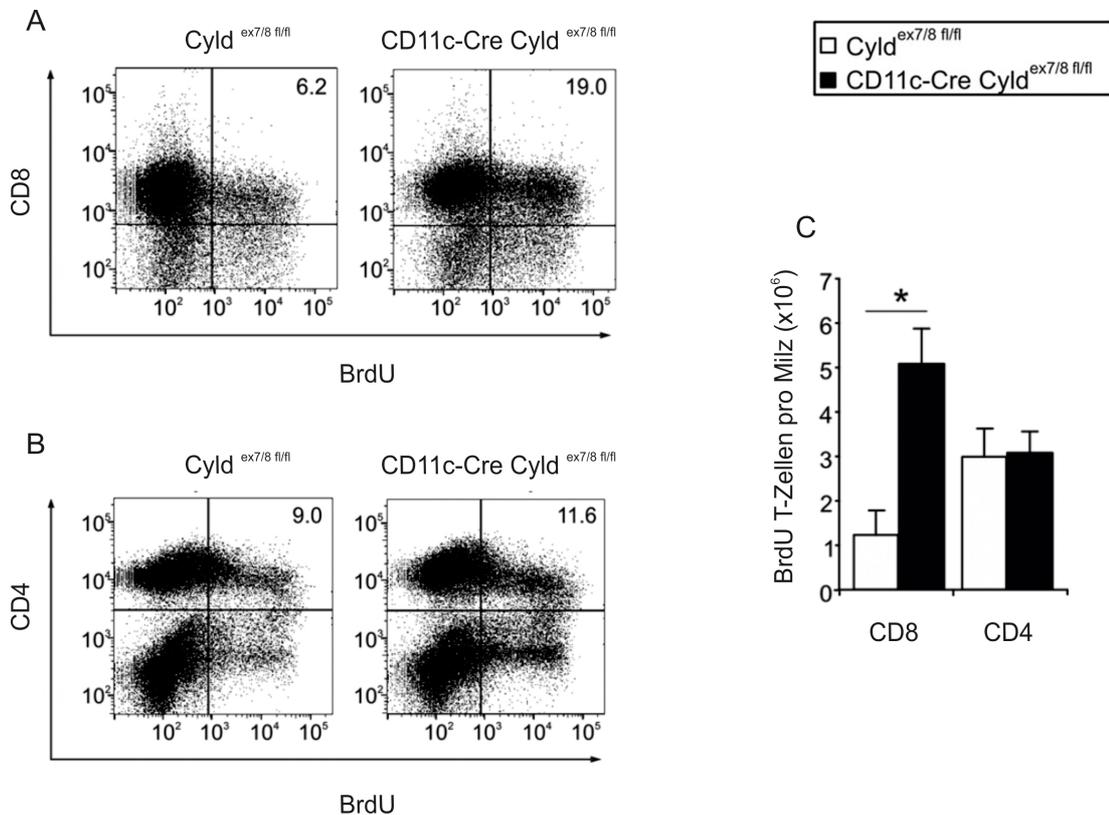


Abb. 19 Durchflusszytometrische Analyse des BrdU-Gehalts von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} und *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäuse wurden mit 3×10^4 *Lm* infiziert und an Tag vier und fünf nach Infektion mit BrdU i.p. behandelt. An Tag sechs nach Infektion wurde die BrdU-Inkorporation in (A) CD8⁺ T-Zellen und (B) CD4⁺ T-Zellen durch Fluoreszenzzytometrie gemessen. Gezeigte Daten sind repräsentativ für sechs Mäuse pro Gruppe. (C) Die absolute Anzahl an BrdU⁺ CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen wird als Mittelwert +/- SD von sechs Mäusen pro Gruppe von einem aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt ($p^* < 0,05$, t-test).

4 Diskussion

Es konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine sCYLD-Überexpression bei fehlender fl-CYLD-Expression in DCs, durch erhöhte Antigenpräsentation und Zytokinproduktion, zur Aktivierung zytotoxischer NK- und T-Zellen führt und in einer verbesserten Immunantwort und Überlebensvorteil gegenüber einer Listerieninfektion resultiert. Dies belegt, dass das Gleichgewicht zwischen fl-CYLD und sCYLD die Zellaktivität von DCs reguliert und identifiziert sCYLD als Antagonisten von fl-CYLD während einer Infektion mit *L. monocytogenes*.

4.1 Hochregulation von sCYLD in *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} DCs nach Listerieninfektion und Schutz vor einer letalen Listerieninfektion

Westernblotanalysen von CD11c⁺ DCs zeigen, dass es nach einer Listerieninfektion zu einer Hochregulation von sCYLD bei *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen (Wildtyp) kommt (siehe 3.1). Die Hochregulation von sCYLD nach Infektion weist auf eine Rolle in der Regulation von DCs bei der Kontrolle einer Listerieninfektion hin. Das durch diese Hochregulation veränderte Verhältnis von sCYLD zu fl-CYLD in DCs infizierter Mäuse, ist wahrscheinlich durch verstärktes Splicen von fl-CYLD zu sCYLD bedingt. Eine gleichartige Hochregulation von sCYLD in BMDC (bone marrow derived dendritic cells) nach Stimulation mit LPS wurde bereits von Srokowski et al. (2009) beschrieben.

Unsere Untersuchungen bezüglich der Überlebensraten beider Mausgruppen zeigen ein verlängertes Überleben von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen bei Infektionsdosen von 1×10^5 *Lm* sowie eine signifikant geringere Bakterienlast bei 3×10^4 *Lm* und 1×10^5 *Lm* in allen untersuchten Organen mit Ausnahme des Gehirns (siehe 3.2/3.3). Eine Überexpression von sCYLD in DCs führt somit neben einer verbesserten Kontrolle einer Listerieninfektion auch zu einem Überlebensvorteil. Bei höheren Infektionsdosen von 1×10^6 *Lm* finden sich zwischen beiden Mausgruppen, weder in den Überlebensraten, noch in der Bakterienlast, in den untersuchten Organen signifikante Unterschiede. Der protektive Effekt von sCYLD ist demnach dosisabhängig. Als Ursache hierfür lassen sich unterschiedliche Hypothesen formulieren. Besonders die hohe Bakterienlast im Gehirn bei Listeriendosen von 1×10^6 *Lm* könnte durch die Entwicklung einer Meningoenzephalitis den leta-

len Ausgang der Erkrankung in beiden Mausgruppen bestimmen. Da DCs als residente Immunzellen im ZNS nur eine untergeordnete Rolle spielen und ihre Funktion als Antigenpräsentierende Zellen hauptsächlich von Mikroglia übernommen wird (D'Agostino et al. 2012), ist es wahrscheinlich, dass das ZNS nur bedingt von der protektiven Funktion einer sCYLD-Überexpression in DCs profitiert. Weiterhin könnte eine Hochregulation anderer antagonistischer Deubiquitinasen bei hohen Listeriendosen (1×10^6 *Lm*) zum Verlust der protektiven Funktion von sCYLD führen. So ist bekannt, dass eine fehlende Funktion von CYLD durch andere DUBs wie A20, welches den NF- κ B-Signalweg ebenfalls negativ reguliert (Shembade et al. 2010), kompensiert werden kann (Sun 2008). Denkbar ist, dass es bei sehr hohen Listeriendosen zu einer vermehrten A20 Bildung kommt, was dann antagonistisch zu sCYLD wirkt. Die Überprüfung einer möglichen A20-Hochregulation bei hohen Listeriendosen (1×10^6 *Lm*) könnte durch Westernblotanalysen durchgeführt werden.

4.2 Normale Invasion von Listerien, aber verstärkte Aktivierung von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} DCs

Untersuchungen bezüglich der Bakterienlast in verschiedenen Zelltypen während den ersten Stunden nach Infektion zeigen, dass Listerien mehrheitlich in CD8 α^+ DCs vorzufinden sind (siehe 3.4). Dies bestätigt die Rolle von CD8 α^+ DCs als hauptsächlicher, zellulärer Eintrittspunkt für *L. monocytogenes* und steht in Einklang mit früheren Untersuchungen (Neuenhahn et al. 2006; Edelson et al. 2011). Beachtenswert ist, dass kein Unterschied in der Zahl der Listerien in CD8 α^+ DCs zwischen beiden Mausgruppen vorliegt. Demzufolge ist der Eintritt der Listerien in CD8 α^+ DCs von dem Gleichgewicht zwischen fl-CYLD und sCYLD unabhängig. Dieses Ergebnis wird durch die annähernd gleiche Bakterienlast in untersuchten Organen an Tag eins nach Infektion unterstützt (siehe 3.3). Im weiteren Verlauf der Infektion vergrößert sich die Zahl an CD8 α^+ DCs und CD11c⁺ DCs bei CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen (siehe 3.8), während die Zahl CD11b⁺ konventioneller DCs und PDCA1⁺ plasmazytoider DCs in beiden Mausgruppen gleich bleibt. Dies unterstreicht erneut die besondere Rolle von CD8 α^+ DCs während einer Listerieninfektion.

Um die zugrundeliegenden Mechanismen des verbesserten Schutzes von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen gegenüber einer Listeriose näher zu betrachten, untersuchten wir die Regulation des NF- κ B-Wegs durch sCYLD. Im Gegensatz zu

fl-CYLD fehlen sCYLD die Bindungsstellen für die NF- κ B-Signalmoleküle TRAF2 und NEMO (Hövelmeyer et al. 2007). Als Deubiquitinase entfernt fl-CYLD unter anderem K63-gebundene Polyubiquitinketten von diesen Signalmolekülen (Kovalenko et al. 2003; Brummelkamp et al. 2003), wodurch deren biologische Funktion und eine konsekutive Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs verhindert wird. Da sCYLD die NEMO- und TRAF2-Bindungsstellen fehlen, bleiben diese Signalmoleküle ubiquitiniert und es kommt zur Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs (vgl. 1.2.1 und 1.4.2).

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass I κ B α in CD8 α^+ DCs von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen in Vergleich zu *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen verstärkt abgebaut wird (siehe 3.5). Daraus folgt eine gesteigerte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in CD8 α^+ DCs von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen. Weitere untersuchte Signalmoleküle, die einer Regulation durch fl-CYLD unterliegen, wie ERK (Sun 2010) und STAT3 (Nishanth et al. 2013) (siehe 3.6), zeigen in unseren Versuchen keine Regulation durch ein verändertes Gleichgewicht zwischen sCYLD und fl-CYLD in CD8 α^+ DCs. Eine Aktivierung des Signalmoleküls p38 war zum untersuchten Zeitpunkt bei beiden Mausgruppen nicht messbar. Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass sCYLD während einer Listerieninfektion ein spezifischer Regulator des NF- κ B-Signalwegs in DCs ist.

Eine Aktivierung des NF- κ B-Wegs führt zur Transkription verschiedener Zielgene. Hierzu gehören Gene für Zytokine, die während einer Listerieninfektion eine wichtige Rolle in der Aktivierung von protektiven Immunzellen und der Regulation der Immunantwort spielen (Hayden et al. 2006). In unseren Versuchen produzieren CD8 α^+ DCs von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen erhöhte Mengen TNF- α , IL-12 und IL-10 (siehe 3.7). Des Weiteren war die IFN- γ mRNA-Expression nach Listerieninfektion in entnommenen Milzen von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen erhöht (siehe 3.7).

TNF- α ist während einer Listerieninfektion ein essentielles, protektiv wirkendes Zytokin. Als Ligand aktiviert TNF- α den NF- κ B- und MAPK-Signalweg und koordiniert die Immunantwort auf eine Infektion (Aggarwal 2003). Weiterhin kann TNF- α die Apoptose von Zielzellen herbeiführen (Decker et al. 1987) und die Phagozytose durch Makrophagen stimulieren (Parameswaran & Patial 2010). Mäuse bei denen die TNF- α Produktion durch Antikörper blockiert wurde, starben bereits bei suble-

talen Listeriendosen (Nakane et al. 1988). Zudem gibt es mehrere Berichte schwerwiegender Listerieninfektionen bei Patienten unter Anti-TNF- α -Therapie (Abreu et al. 2013). Maßgebliche Produzenten von TNF- α während einer Listerieninfektion sind die von Monozyten abstammenden, inflammatorischen TNF/iNOS produzierenden (Tip)-DC (Serbina et al. 2003). Unsere Versuche zeigen eine nach Infektion stark erhöhte Produktion von TNF- α auch in CD8 α^+ DCs, was ein Grund für die bessere Kontrolle der Listerieninfektion in CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen sein könnte. Interessant für zukünftige Versuche wäre die Frage, ob Tip-DCs von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen verglichen mit *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} ebenfalls mehr TNF- α produzieren.

IL-12, ein weiteres wichtiges protektives Zytokin im Rahmen einer Listeriose, wird hauptsächlich von CD8 α^+ DCs produziert (Mitchell et al. 2011; Kapadia et al. 2011). Versuche von Brombacher et al (1999) zeigten, dass IL-12p35^{-/-} Mäuse verglichen mit Wildtypmäusen nach Infektion mit subletalen Dosen von *L. monocytogenes* eine höhere Bakterienlast in ihren Organen aufwiesen und bereits in der ersten Woche nach Infektion verstarben. Weiterhin produzierten diese Mäuse weniger IFN- γ , das unerlässlich für die Aktivierung von Makrophagen während einer Listerieninfektion ist. Bekannt ist, dass IL-12 zur erhöhten IFN- γ Produktion von NK- und T-Zellen führt (Tripp et al. 1994; Henry et al. 2008). In Einklang mit der verstärkten Produktion von IL-12 durch CD8 α^+ DCs in CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen (siehe 3.7) war die IFN- γ Produktion durch NK- und listerienspezifische T-Zellen von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen gesteigert (siehe 3.11/3.12). Weiterhin war die IFN- γ mRNA-Expression in Milzen von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen nach Infektion signifikant erhöht (siehe 3.7).

IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, welches die Synthese der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β (Opp et al. 1995), IL-12 (Aste-Amezaga et al. 1998) und IFN- γ (Varma et al. 2001) inhibiert. Während einer Infektion hat es vor allem die Aufgabe eine überschießende, proinflammatorische Immunantwort zu verhindern. Mäuse, bei denen eine Blockade des IL-10 Rezeptors durchgeführt wurde, waren vor einer letalen Listeriose geschützt (Silva & Appelberg 2001). In unseren Experimenten wird IL-10 nach Listerieninfektion erwartungsgemäß in CD8 α^+ DCs beider Mausgruppen herunterreguliert. Die Menge an IL-10 ist jedoch in CD8 α^+ DCs von CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen höher als bei *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen. Ursache für

diesen erhöhten IL-10 Spiegel könnte die Notwendigkeit einer Regulation der weit- aus größeren proinflammatorischen Immunantwort in CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen sein.

Bei der Organentnahme für Experimente viel wiederholt auf, dass die Milzen von CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen verglichen mit Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen ein größeres Organvolumen und höhere Leukozytenzahlen aufwiesen (siehe 3.8). Diese Veränderungen werden durch Expansion der CD11c⁺ - und CD8 α ⁺ DCs sowie CD8⁺ T-Zellen ausgelöst. Da Zielgene des NF- κ B-Signalwegs Zellentwicklung und Zellwachstum beeinflussen (Gerondakis & Siebenlist 2010), ist es wahrscheinlich, dass die Proliferation der DCs in CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen durch Hochregulation dieses Signalwegs ausgelöst wird. Durch die erhöhte Zytokinproduktion, besonders von IL-12, welches für eine optimale klonale Expansion und Proliferation von CD8⁺ T-Zellen benötigt wird (Valenzuela et al. 2002) und verbesserte Antigenpräsentation der DCs von CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen, findet nachfolgend eine Expansion der CD8⁺ T-Zellpopulation statt. Interessant ist, dass die Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bei beiden Mausgruppen nach Infektion zunächst abnimmt. Diese Beobachtung geht mit früheren Erkenntnissen einher, dass Listerien T-Zell Apoptose induzieren (Mannering et al. 2002). Da diese Entwicklung jedoch in beiden Mausgruppen gleichartig abläuft, scheint das Verhältnis zwischen fl-CYLD und sCYLD die Listerien-induzierte T-Zell Apoptose nicht zu beeinflussen.

Zusätzlich zur der signifikant erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine durch CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} CD8 α ⁺ DCs, ist nach Infektion die Expression von MHC-Klasse-II Antigen erhöht (siehe 3.9). MHC-Klasse-II Antigene werden auf Antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und dienen der Präsentation lysosomal abgebauter Bakterienbestandteile an CD4⁺ T-Zellen. Die Expression von MHC-Klasse-II Antigen wird durch Interaktion von IFN- γ mit MHC class II transactivator (MHC CIITA) (Steimle et al. 1994) und über den NF- κ B-Signalweg gesteuert (Yoshimura et al. 2001). Die bei CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen erhöhte IFN- γ Produktion durch NK- und T-Zellen (siehe 3.11/3.12) sowie die verstärkte NF- κ B Aktivierung in CD8 α ⁺ DCs (siehe 3.5) führen synergistisch zu der erhöhten MHC-Klasse-II Antigen Expression. Hierdurch, sowie mittels ihrer verstärkten Zytokinproduktion, können CD8 α ⁺ DCs von CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen in verbessertem Maße als Antigenpräsentierende Zellen mit anderen Zellen kommunizieren. Die Menge der kostimu-

latorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40, die ebenfalls NF- κ B abhängig sind (Yoshimura et al. 2001), war auf der Zelloberfläche von DCs bei beiden Mausgruppen gleich. Diese kostimulatorischen Moleküle scheinen somit keiner Regulation durch sCYLD zu unterliegen.

4.3 Verstärkte Aktivierung von NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen durch CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} DCs

NK-Zellen von CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen produzieren nach Aktivierung durch IL-12 verglichen mit Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen vermehrt IFN- γ (siehe 3.10). Dieses Zytokin wird benötigt um Makrophagen zu aktivieren, die Listerien daraufhin durch Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies abtöten. Studien von Buchmeier & Schreiber (1985) zeigten, dass die Gabe eines IFN- γ Antikörpers während einer Listerieninfektion die Aktivierung von Makrophagen verhinderte und somit zu einer verminderten Bakterienclearance und erhöhter Letalität in untersuchten Mäusen führte. Ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende Experimente in Bezug auf unser Infektionsmodell könnte die Überprüfung der durch die erhöhte Produktion von IFN- γ wahrscheinlich gesteigerten Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies durch Makrophagen sein. Zusätzlich zu ihrer gesteigerten IFN- γ Produktion haben NK-Zellen von CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen eine erhöhte zytotoxische Aktivität, gemessen an ihrer besseren Abtötung von RMA-S Zellen (siehe 3.11) und haben somit einen direkten Einfluss auf die Bakterienclearance.

CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sind während einer Listerieninfektion ebenfalls wichtige IFN- γ Produzenten (Daugelat et al. 1994; D’Orazio et al. 2006). In unseren Experimenten zeigt sich, dass *LmOVA* spezifische CD8⁺ T-Zellen und in geringerem Maße auch CD4⁺ T-Zellen von CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen signifikant mehr IFN- γ produzieren (siehe 3.12). Sie leisten somit zusammen mit den ebenfalls IFN- γ produzierenden NK-Zellen einen signifikanten Beitrag zur Infektabwehr. In dem von uns durchgeführten Antigen-Präsentations-Assay, zeigt sich eine signifikant erhöhte β -Galaktosidase-Expression und somit verstärkte Aktivierung des untersuchten *LmOVA*-spezifischen CD8⁺ T-Zell Hybridomas bei Kokultivierung mit DCs von CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen (siehe 3.13). Eine detailliertere Analyse der *LmOVA*-spezifischen T-Zellantwort zeigt weiterhin, dass es in der Milz von infizierten CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Mäusen zu einer signifikant erhöhten CD8⁺

T-Zellproliferation kommt. Die Proliferation und absolute Anzahl an CD4⁺ T-Zellen ist hingegen nicht signifikant erhöht (siehe 3.14). Zusammengefasst ist diese verstärkte Aktivierung *LmOVA*-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit DCs aus *LmOVA*-infizierten CD11c-Cre *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} Mäusen ein direkter Beleg für die verstärkte Antigenpräsentation dieser spezifischen DCs im Vergleich zu *Cyld*^{ex7/8 fl/fl} DCs.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit identifiziert sCYLD als einen Antagonisten von fl-CYLD, welcher die Aktivierung von DCs während einer Infektion mit *L. monocytogenes* maßgeblich reguliert. Eine sCYLD-Überexpression bei fehlendem fl-CYLD in DCs resultiert in einer Hochregulation des NF- κ B-Signalwegs, was durch Produktion proinflammatorischer Zytokine und einer gesteigerten Interaktion von DCs mit NK- und T-Zellen zu einer verbesserten Immunantwort gegen *L. monocytogenes* führt.

Es stellt sich die Frage, ob ein verändertes Gleichgewicht zwischen sCYLD und fl-CYLD in DCs auch therapeutisch genutzt werden könnte. Angesichts voranschreitender Antibiotika- und Virostatikaresistenzen, der eine geringe Zahl neu entwickelter Medikamente gegenüberstehen, ist es von großer Wichtigkeit, neue Methoden zur Infektionsbehandlung zu entwickeln. In einer Reihe muriner Modelle wurde die Möglichkeit der Vakzinierung mit DCs bereits erprobt. So zeigte sich, dass DC-Vakzinierung zu protektiver Immunität bei Leishmaniose (Agallou et al. 2011), Herpes simplex (Schön et al. 2001), Influenza (Konduri et al. 2013), Candida (Kundu & Noverr 2011) und HIV-Infektionen (Lu et al. 2004) führt. Im Jahr 2012 wurde erstmals ein DC-Vakzin bei Patienten mit chronischer Hepatitis C getestet (Zabaleta et al. 2015). Ein bereits bekanntes Problem der DC-Vakzinierung zeigte sich allerdings auch in dieser klinischen Studie. Die DCs der Patienten produzierten nach Transduktion große Mengen des antiinflammatorischen Zytokins IL-10, welches wiederum zur Aktivierung regulatorischer T-Zellen und einer somit verminderten Immunantwort führte. Eine Überexpression von sCYLD in DCs könnte dieses Problem durch eine verstärkte NF- κ B-Aktivierung und der daraus folgenden Produktion proinflammatorischer, zytotoxischer T-Zellen aktivierender, Zytokine lösen. Um eine sCYLD-Überexpression in von Patienten entnommenen DCs herbeizuführen, könnte ein CYLD Knockdown durch siRNA durchgeführt und anschließend sCYLD mittels eines Vektors in die Zellen eingebracht werden.

Das Prinzip der selektiven sCYLD-Überexpression durch Einbringen eines Vektors in DCs könnte auch in der Immuntherapie maligner Erkrankungen von Nutzen sein. Seit mehreren Jahren werden DCs experimentell eingesetzt, um die Tumor-Antigen spezifische T-Zellantwort zu verbessern. 2010 erhielt das DC-Vakzin Sipuleucel-T

(APC 8015) die FDA-Zulassung zur Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms. Als problematisch bei der Tumortherapie mit DCs hat sich erwiesen, dass Tumorzellen über verschiedene Mechanismen verfügen, um die Kapazität von DCs als Antigenpräsentierende Zelle abzuschwächen. Da DCs mit einer selektiven sCYLD-Überexpression sowohl ein besseres Antigenpräsentationsvermögen, als auch ein verbessertes Vermögen zur Aktivierung von NK-Zellen und T-Zellen durch Zytokinproduktion aufweisen, könnte dies eine Möglichkeit sein, die Herunterregulation der DCs durch Tumorzellen zu umgehen und somit eine gesteigerte Immunantwort gegen den Tumor hervorzurufen.

Diese therapeutischen Ansätze sind jedoch noch rein hypothetischer Natur. Bevor an einen therapeutischen Einsatz von sCYLD gedacht werden kann, ist noch intensive Forschung hinsichtlich der Expression und der Aufgabe von sCYLD sowohl in murinen, als auch in humanen Zellen nötig. Durch murine konditionelle Knockout-Modelle wurde bereits die Auswirkung einer Zelltyp-spezifischen sCYLD-Überexpression in DCs (Wurm et al. 2015) sowie in Hepatozyten untersucht (Urbanik et al. 2012). Weitere konditionelle Knockoutmodelle könnten einen interessanten Einblick in die Funktion von sCYLD in anderen Zellpopulationen und Organsystemen liefern. Des Weiteren wäre es interessant, den von Hövelmeyer (2006) beschriebenen Einfluss von sCYLD auf die Spermatogenese und den metabolischen Phänotyp von *Cyld*^{ex7/8} Mäusen, näher zu untersuchen.

Bis dato gibt es noch keine Studien zu Auftreten und Funktion von sCYLD im humanen Organismus. Während die Rolle von fl-CYLD in der Onkogenese und Inflammation beim Menschen schon eingehend untersucht wurde, ist bisher unklar, ob die natürlich vorkommende Splicevariante sCYLD hier ebenfalls eine Rolle spielt. Es wäre denkbar, dass nicht nur ein fl-CYLD-Mangel, sondern auch eine sCYLD-Überexpression zu einer Beeinflussung biologischer Tumoraktivität und chronisch entzündlicher Erkrankungen wie Colitis ulcerosa und M. Crohn führt. Bisher ist jedoch weder bekannt ob sCYLD beim Menschen exprimiert wird, noch ob die sCYLD Expression in diesen Zusammenhängen eine Rolle spielt. Dies könnte eine interessante Fragestellung zukünftiger Studien sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Abreu C, Magro F, Vilas-Boas F, Lopes S, Macedo G, Sarmiento A: Listeria infection in patients on anti-TNF treatment: report of two cases and review of the literature. *J. Crohns. Colitis* 7. 175–182 (2013)
2. Adhikari A, Xu M, Chen ZJ: Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene* 26. 3214–3226 (2007)
3. Agallou M, Margaroni M, Karagouni E: Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of *Leishmania infantum* KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine* 29. 5053–5064 (2011)
4. Aggarwal BB: Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 3. 745–756 (2003)
5. Alvarez-Dominguez C, Roberts R, Stahl PD: Internalized *Listeria monocytogenes* modulates intracellular trafficking and delays maturation of the phagosome. *J. Cell Sci.* 110. 731–743 (1997)
6. Aoshi T, Carrero JA, Konjufca V, Koide Y, Unanue ER, Miller MJ: The cellular niche of *Listeria monocytogenes* infection changes rapidly in the spleen. *Eur. J. Immunol.* 39. 417–425 (2009)
7. Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G: Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J. Immunol.* 160. 5936–5944 (1998)
8. Bancroft GJ, Sheehan KC, Schreiber RD, Unanue ER: Tumor necrosis factor is involved in the T cell-independent pathway of macrophage activation in scid mice. *J. Immunol.* 143. 127–130 (1989)
9. Bassères DS, Baldwin AS: Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 25. 6817–6830 (2006)
10. Belz GT, Shortman K, Bevan MJ, Heath WR: CD8alpha+ dendritic cells selectively present MHC class I-restricted noncytolytic viral and intracellular bacterial antigens in vivo. *J. Immunol.* 175. 196–200 (2005)

11. Bhardwaj V, Kanagawa O, Swanson PE, Unanue ER: 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 (1998)
12. Biggs PJ, Wooster R, Ford D, Chapman P, Mangion J, Quirk Y, Easton DF, Burn J, Stratton MR: Familial cylindromatosis (turban tumour syndrome) gene localised to chromosome 16q12-q13: evidence for its role as a tumour suppressor gene. *Nat. Genet.* 11. 441–443 (1995)
13. Bignell GR, Warren W, Seal S, Takahashi M, Rapley E, Barfoot R, Green H, Brown C, Biggs PJ, Lakhani SR, Jones C, Hansen J, Blair E, Hofmann B, Siebert R, Turner G, Evans DG, Schrandt-Stumpel C, Beemer FA, et al.: Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat. Genet.* 25. 160–165 (2000)
14. Brombacher F: IL-12 is dispensable for innate and adaptive immunity against low doses of *Listeria monocytogenes*. *Int. Immunol.* 11. 325–332 (1999)
15. Brummelkamp TR, Nijman SMB, Dirac AMG, Bernards R: Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* 424. 797–801 (2003)
16. Buchmeier NA, Schreiber RD: Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82. 7404–7408 (1985)
17. Chang E-J, Kundu JK, Liu L, Shin J-W, Surh Y-J: Ultraviolet B radiation activates NF- κ B and induces iNOS expression in HR-1 hairless mouse skin: role of I κ B kinase- β . *Mol. Carcinog.* 50. 310–317 (2011)
18. Chen ZJ: Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat. Cell Biol.* 7. 758–765 (2005)
19. Conlan JW: Early pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection in the mouse spleen. *J. Med. Microbiol.* 44. 295–302 (1996)
20. Cossart P: Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108. 19484–19491 (2011)

21. Costello CM, Mah N, Häsler R, Rosenstiel P, Waetzig GH, Hahn A, Lu T, Gurbuz Y, Nikolaus S, Albrecht M, Hampe J, Lucius R, Klöppel G, Eickhoff H, Lehrach H, Lengauer T, Schreiber S: Dissection of the inflammatory bowel disease transcriptome using genome-wide cDNA microarrays. *PLoS Med.* 2. e199 (2005)
22. Courtois G, Gilmore TD: Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* 25. 6831–6843 (2006)
23. Culver C, Sundqvist A, Mudie S, Melvin A, Xirodimas D, Rocha S: Mechanism of hypoxia-induced NF-kappaB. *Mol. Cell. Biol.* 30. 4901–4921 (2010)
24. D’Agostino PM, Gottfried-Blackmore A, Anandasabapathy N, Bulloch K: Brain dendritic cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 124. 599–614 (2012)
25. D’Orazio SEF, Troese MJ, Starnbach MN: Cytosolic localization of *Listeria monocytogenes* triggers an early IFN-gamma response by CD8+ T cells that correlates with innate resistance to infection. *J. Immunol.* 177. 7146–7154 (2006)
26. Dalrymple SA, Lucian LA, Slattery R, McNeil T, Aud DM, Fuchino S, Lee F, Murray R: Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia. *Infect. Immun.* 63. 2262–2268 (1995)
27. Daugelat S, Ladel CH, Schoel B, Kaufmann SH: Antigen-specific T-cell responses during primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.* 62. 1881–1888 (1994)
28. Decker T, Lohmann-Matthes ML, Gifford GE: Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *J. Immunol.* 138. 957–962 (1987)
29. Drevets D a, Sawyer RT, Potter T a, Campbell P a: *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect Immun* 63. 4268–4276 (1995)
30. Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, Gélinas C: Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene* 25. 6800–6816 (2006)

31. Ebe Y, Hasegawa G, Takatsuka H, Umezu H, Mitsuyama M, Arakawa M, Mukaida N, Naito M: The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration into the liver by macrophage inflammatory protein-2 in primary listeriosis in mice. *Pathol. Int.* 49. 519–532 (1999)
32. Edelson BT, Bradstreet TR, Hildner K, Carrero J a., Frederick KE, Wumesh KC, Belizaire R, Aoshi T, Schreiber RD, Miller MJ, Murphy TL, Unanue ER, Murphy KM, KC W, Belizaire R, Aoshi T, Schreiber RD, Miller MJ, Murphy TL, et al.: CD8 α + Dendritic Cells Are an Obligate Cellular Entry Point for Productive Infection by *Listeria monocytogenes*. *Immunity* 35. 236–248 (2011)
33. Erdmann G, Potel J: Listeriosis in newborn: granulomatosis infantiseptica, until now so-called pseudotuberculosis. *Zeitschrift für Kinderheilkd.* 73. 113–132 (1953)
34. Forman HJ, Torres M: Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166. 4–8 (2002)
35. Gaillard JL, Berche P, Mounier J, Richard S, Sansonetti P: In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* 55. 2822–2829 (1987)
36. Gao J, Huo L, Sun X, Liu M, Li D, Dong J-T, Zhou J: The tumor suppressor CYLD regulates microtubule dynamics and plays a role in cell migration. *J. Biol. Chem.* 283. 8802–8809 (2008)
37. Gardam S, Brink R: Non-Canonical NF- κ B Signaling Initiated by BAFF Influences B Cell Biology at Multiple Junctions. *Front. Immunol.* 4. 1–12 (2014)
38. Gerondakis S, Siebenlist U: Roles of the NF-kappaB pathway in lymphocyte development and function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2. 1–29 (2010)
39. Gong B, Leznik E: The role of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 in neurodegenerative disorders. *Drug News Perspect.* 20. 365–370 (2007)
40. Gregory SH, Barczynski LK, Wing EJ: Effector function of hepatocytes and Kupffer cells in the resolution of systemic bacterial infections. *J. Leukoc. Biol.* 51. 421–424 (1992)
41. Gregory SH, Sagnimeni AJ, Wing EJ: Bacteria in the bloodstream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils. *J. Immunol.* 157. 2514–2520 (1996)

42. Grenningloh R, Darji a, Wehland J, Chakraborty T, Weiss S: Listeriolysin and IrpA are major protein targets of the human humoral response against *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 65. 3976–3980 (1997)
43. Harty JT, Badovinac VP: Influence of effector molecules on the CD8(+) T cell response to infection. *Curr. Opin. Immunol.* 14. 360–365 (2002)
44. Harty JT, Bevan MJ: Specific immunity to *Listeria monocytogenes* in the absence of IFN gamma. *Immunity* 3. 109–117 (1995)
45. Havell EA: Production of tumor necrosis factor during murine listeriosis. *J. Immunol.* 139. 4225–4231 (1987)
46. Hayden MS, Ghosh S: NF- κ B in immunobiology. *Cell Res.* 21. 223–244 (2011)
47. Hayden MS, Ghosh S: NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 26. 203–234 (2012)
48. Hayden MS, West AP, Ghosh S: NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25. 6758–6780 (2006)
49. Henry CJ, Ornelles D a, Mitchell LM, Brzoza-Lewis KL, Hiltbold EM: IL-12 produced by dendritic cells augments CD8+ T cell activation through the production of the chemokines CCL1 and CCL17. *J. Immunol.* 181. 8576–8584 (2008)
50. Hershko A, Ciechanover A: The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67. 425–479 (1998)
51. Heymer B, Wirsing von König CH, Finger H, Hof H, Emmerling P: Histomorphology of experimental listeriosis. *Infection* 16. 106–111 (1988)
52. Hilliard BA, Mason N, Xu L, Sun J, Lamhamedi-Cherradi S-E, Liou H-C, Hunter C, Chen YH: Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *J. Clin. Invest.* 110. 843–850 (2002)
53. Ho JL, Shands KN, Friedland G, Eckind P, Fraser DW: An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Arch. Intern. Med.* 146. 520–524 (1986)

54. Hochstrasser M: Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7. 215–223 (1995)
55. Hövelmeyer N: Targeted mutation of the tumour suppressor gene CYLD reveals a novel role in adaptive immunity. *Diss. Univ. Köln* 1–101 (2006)
56. Hövelmeyer N, Wunderlich FT, Massoumi R, Jakobsen CG, Song J, Wörns M a, Merkwirth C, Kovalenko A, Aumailley M, Strand D, Brüning JC, Galle PR, Wallach D, Fässler R, Waisman A: Regulation of B cell homeostasis and activation by the tumor suppressor gene CYLD. *J. Exp. Med.* 204. 2615–2627 (2007)
57. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O’Garra A, Murphy KM: Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260. 547–549 (1993)
58. Huang D-H, Wang G-Y, Zhang J-W, Li Y, Zeng X-C, Jiang N: MiR-501-5p regulates CYLD expression and promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 45. 738–744 (2015)
59. Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, Vilcek J, Zinkernagel RM, Aguet M: Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 259. 1742–1745 (1993)
60. Idoyaga J, Suda N, Suda K, Park CG, Steinman RM: Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8alpha+ dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106. 1524–1529 (2009)
61. Jensen VB, Harty JT, Jones BD: Interactions of the invasive pathogens *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, and *Shigella flexneri* with M cells and murine Peyer’s patches. *Infect. Immun.* 66. 3758–3766 (1998)
62. Jin W, Chang M, Paul EM, Babu G, Lee AJ, Reiley W, Wright A, Zhang M, You J, Sun S-C: Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates RANK signaling and osteoclastogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* 118. 1858–1866 (2008)
63. Jurado RL, Farley MM, Pereira E, Harvey RC, Schuchat A, Wenger JD, Stephens DS: Increased Risk of Meningitis and Bacteremia Due to *Listeria monocytogenes* in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clin. Infect. Dis.* 17. 224–227 (1993)

64. Kang S-J, Liang H-E, Reizis B, Locksley RM: Regulation of hierarchical clustering and activation of innate immune cells by dendritic cells. *Immunity* 29. 819–833 (2008)
65. Kapadia D, Sadikovic A, Vanloubbeeck Y, Brockstedt D, Fong L: Interplay between CD8 α ⁺ dendritic cells and monocytes in response to *Listeria monocytogenes* infection attenuates T cell responses. *PLoS One* 6. 1–9 (2011)
66. Ke H, Augustine CK, Gandham VD, Jin JY, Tyler DS, Akiyama SK, Hall RP, Zhang JY: CYLD inhibits melanoma growth and progression through suppression of the JNK/AP-1 and β 1-integrin signaling pathways. *J. Invest. Dermatol.* 133. 221–229 (2013)
67. Kobayashi T, Walsh PT, Walsh MC, Speirs KM, Chiffolleau E, King CG, Hancock WW, Caamano JH, Hunter CA, Scott P, Turka LA, Choi Y: TRAF6 Is a Critical Factor for Dendritic Cell Maturation and Development. *Immunity* 19. 353–363 (2003)
68. Koga T, Lim JH, Jono H, Ha UH, Xu H, Ishinaga H, Morino S, Xu X, Yan C, Kai H, Li J-D: Tumor suppressor cylindromatosis acts as a negative regulator for *Streptococcus pneumoniae*-induced NFAT signaling. *J. Biol. Chem.* 283. 12546–12554 (2008)
69. Konduri V, Decker WK, Halpert MM, Gilbert B, Safdar A: Modeling dendritic cell vaccination for influenza prophylaxis: potential applications for niche populations. *J. Infect. Dis.* 207. 1764–1772 (2013)
70. Koufakis T, Chatzopoulou M, Margaritis A, Tsiakalou M, Gabranis I: Pneumonia by *Listeria monocytogenes*: A Common Infection by an Uncommon Pathogen. *Case Rep. Infect. Dis.* 2015. 1–3 (2015)
71. Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israël A, Wallach D, Courtois G: The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* 424. 801–805 (2003)
72. Kundu G, Noverr MC: Exposure to host or fungal PGE₂ abrogates protection following immunization with *Candida*-pulsed dendritic cells. *Med. Mycol.* 49. 380–394 (2011)
73. Kursar M, Kohler A, Kaufmann SHE, Mittrucker H-W: Depletion of CD4⁺ T Cells during Immunization with Nonviable *Listeria monocytogenes* Causes Enhanced CD8⁺ T Cell-Mediated Protection against Listeriosis. *J. Immunol.* 172. 3167–3172 (2004)

74. Larsson S, Cederberg A, Ivarsson S, Svanberg L, Cronberg S: *Listeria monocytogenes* causing hospital-acquired enterocolitis and meningitis in newborn infants. *Br. Med. J.* 2. 473–474 (1978)
75. Lebreton-Mansuy A: *Listeria monocytogenes*, an opportunistic foodborne pathogen. Unter http://alicelebreton.free.fr/images/Listeria_Patho.png (2016) abgerufen am 1.5.2016
76. Lemos MP, Fan L, Lo D, Laufer TM: CD8 + and CD11b+ Dendritic Cell-Restricted MHC Class II Controls Th1 CD4+ T Cell Immunity. *J. Immunol.* 171. 5077–5084 (2003)
77. Lim JH, Jono H, Koga T, Woo C-H, Ishinaga H, Bourne P, Xu H, Ha U-H, Xu H, Li J-D: Tumor suppressor CYLD acts as a negative regulator for non-typeable *Haemophilus influenzae*-induced inflammation in the middle ear and lung of mice. *PLoS One* 2. 1–10 (2007)
78. Lin M-L, Zhan Y, Villadangos JA, Lew AM: The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets. *Immunol. Cell Biol.* 86. 353–362 (2008)
79. Liu Z, Cheers C: The cellular source of interleukin-6 during *Listeria* infection. *Infect. Immun.* 61. 2626–2631 (1993)
80. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25. 402–408 (2001)
81. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu J-M: Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat. Med.* 10. 1359–1365 (2004)
82. MacMicking J, Xie QW, Nathan C: Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15. 323–350 (1997)
83. Mahoney DJ, Cheung HH, Mrad RL, Plenchette S, Simard C, Enwere E, Arora V, Mak TW, Lacasse EC, Waring J, Korneluk RG: Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF α -mediated NF- κ B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105. 11778–11783 (2008)
84. Mannering SI, Zhong J, Cheers C: T-cell activation, proliferation and apoptosis in primary *Listeria monocytogenes* infection. *Immunology* 106. 87–95 (2002)

85. Massoumi R, Chmielarska K, Hennecke K, Pfeifer A, Fässler R: Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell* 125. 665–677 (2006)
86. Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mege RM, Cossart P: E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 84. 923–932 (1996)
87. Mitchell LM, Brzoza-Lewis KL, Henry CJ, Grayson JM, Westcott MM, Hiltbold EM: Distinct responses of splenic dendritic cell subsets to infection with *Listeria monocytogenes*: maturation phenotype, level of infection, and T cell priming capacity *ex vivo*. *Cell. Immunol.* 268. 79–86 (2011)
88. Moquin DM, McQuade T, Chan FK-M: CYLD deubiquitinates RIP1 in the TNF α -induced necrosome to facilitate kinase activation and programmed necrosis. *PLoS One* 8. 1–15 (2013)
89. Murray EGD, Webb RA, Swann MBR: A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J. Pathol. Bacteriol.* 29. 407–439 (1926)
90. Mylonakis E, Paliou M, Hohmann EL, Calderwood SB, Wing EJ: Listeriosis during pregnancy: a case series and review of 222 cases. *Medicine (Baltimore)*. 81. 260–269 (2002)
91. Nakane A, Minagawa T, Kato K: Endogenous tumor necrosis factor (cachectin) is essential to host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.* 56. 2563–2569 (1988)
92. Neuenhahn M, Kerksiek KM, Nauwerth M, Suhre MH, Schiemann M, Gebhardt FE, Stemberger C, Panthel K, Schröder S, Chakraborty T, Jung S, Hochrein H, Rüssmann H, Brocker T, Busch DH: CD8 α + Dendritic Cells Are Required for Efficient Entry of *Listeria monocytogenes* into the Spleen. *Immunity* 25. 619–630 (2006)
93. Nijman SMB, Luna-Vargas MPA, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AMG, Sixma TK, Bernards R: A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123. 773–786 (2005)
94. Nishanth G: Regulation of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) by protein Kinase C theta (PKC- θ) and cylindromatosis (CYLD) in murine listeriosis and toxoplasmosis. *Diss. Univ. Magdeburg* 1–97 (2013)

95. Nishanth G, Deckert M, Wex K, Massoumi R, Schweitzer K, Naumann M, Schlüter D: CYLD Enhances Severe Listeriosis by Impairing IL-6/STAT3-Dependent Fibrin Production. *PLoS Pathog.* 9. 1–17 (2013)
96. Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H, Zinkernagel RM: Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286. 2156–2159 (1999)
97. Ooi ST, Lorber B: Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clin. Infect. Dis.* 40. 1327–1332 (2005)
98. Opp MR, Smith EM, Hughes TK: Interleukin-10 (cytokine synthesis inhibitory factor) acts in the central nervous system of rats to reduce sleep. *J. Neuroimmunol.* 60. 165–168 (1995)
99. Ouaz F, Arron J, Zheng Y, Choi Y, Beg AA: Dendritic Cell Development and Survival Require Distinct NF- κ B Subunits. *Immunity* 16. 257–270 (2002)
100. Pamer EG: Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat. Rev. Immunol.* 4. 812–823 (2004)
101. Parameswaran N, Patial S: Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 20. 87–103 (2010)
102. Perkins ND: Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8. 49–62 (2007)
103. Pianetti S, Arsura M, Romieu-Mourez R, Coffey RJ, Sonenshein GE: Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of IkappaB-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN. *Oncogene* 20. 1287–1299 (2001)
104. Pust S, Morrison H, Wehland J, Sechi AS, Herrlich P: *Listeria monocytogenes* exploits ERM protein functions to efficiently spread from cell to cell. *EMBO J.* 24. 1287–1300 (2005)
105. Regamey A, Hohl D, Liu JW, Roger T, Kogerman P, Toftgard R, Huber M: The tumor suppressor CYLD interacts with TRIP and regulates negatively nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 198. 1959–1964 (2003)

106. Reiley W, Zhang M, Sun S-C: Negative regulation of JNK signaling by the tumor suppressor CYLD. *J. Biol. Chem.* 279. 55161–55167 (2004)
107. Reis O, Sousa S, Camejo A, Villiers V, Gouin E, Cossart P, Cabanes D: LapB, a novel *Listeria monocytogenes* LPXTG surface adhesin, required for entry into eukaryotic cells and virulence. *J. Infect. Dis.* 202. 551–562 (2010)
108. Rieser E, Cordier SM, Walczak H: Linear ubiquitination: a newly discovered regulator of cell signalling. *Trends Biochem. Sci.* 38. 94–102 (2013)
109. Robbins JR, Barth AI, Marquis H, de Hostos EL, Nelson WJ, Theriot J a.: *Listeria monocytogenes* exploits normal host cell processes to spread from cell to cell. *J. Cell Biol.* 146. 1333–1349 (1999)
110. Rogers HW, Unanue ER: Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect. Immun.* 61. 5090–5096 (1993)
111. Schön E, Harandi AM, Nordström I, Holmgren J, Eriksson K: Dendritic cell vaccination protects mice against lethality caused by genital herpes simplex virus type 2 infection. *J. Reprod. Immunol.* 50. 87–104 (2001)
112. Schuchat A, Deaver KA, Wenger JD, Plikaytis BD, Mascola L, Pinner RW, Reingold AL, Broome C V: Role of foods in sporadic listeriosis. I. Case-control study of dietary risk factors. The *Listeria* Study Group. *JAMA* 267. 2041–2050 (1992)
113. Segal AW: How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23. 197–223 (2005)
114. Serbina N V, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG: TNF/iNOS-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection. *Immunity* 19. 59–70 (2003)
115. Shedlock DJ, Shen H: Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300. 337–339 (2003)
116. Shembade N, Ma A, Harhaj EW: Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science* 327. 1135–1139 (2010)
117. Shen H, Whitmire JK, Fan X, Shedlock DJ, Kaech SM, Ahmed R: A specific role for B cells in the generation of CD8 T cell memory by recombinant *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 170. 1443–1451 (2003)

118. Silva RA, Appelberg R: Blocking the receptor for interleukin 10 protects mice from lethal listeriosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45. 1312–1314 (2001)
119. Skeen MJ, Miller MA, Shinnick TM, Ziegler HK: Regulation of murine macrophage IL-12 production. Activation of macrophages in vivo, restimulation in vitro, and modulation by other cytokines. *J. Immunol.* 156. 1196–1206 (1996)
120. Skoberne M, Schenk S, Hof H, Geginat G: Cross-presentation of *Listeria monocytogenes*-derived CD4 T cell epitopes. *J. Immunol.* 169. 1410–1418 (2002)
121. Southwick FS, Purich DL: *Listeria* and *Shigella* actin-based motility in host cells. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 109. 160–173 (1998)
122. Srokowski CC, Masri J, Ho N, Krembel AK, Tertilt C, Strand D, Mahnke K, Massoumi R, Waisman A: Naturally occurring short splice variant of CYLD positively regulates dendritic cell function. *Analysis* 113. 5891–5895 (2009)
123. Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Grospierre B, Mach B: Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science.* 265. 106–109 (1994)
124. Sun B, Li L, Ma W, Wang S, Huang C: MiR-130b inhibits proliferation and induces apoptosis of gastric cancer cells via CYLD. *Tumour Biol.* Advance online publication (2015)
125. Sun JC, Bevan MJ: Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300. 339–342 (2003)
126. Sun S-C: CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF-kappaB activation and diverse biological processes. *Cell Death Differ.* 17. 25–34 (2010)
127. Sun S-C: Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 8. 501–511 (2008)
128. Theriot JA, Mitchison TJ, Tilney LG, Portnoy DA: The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature* 357. 257–260 (1992)
129. Tripp CS, Gately MK, Hakimi J, Ling P, Unanue ER: Neutralization of IL-12 decreases resistance to *Listeria* in SCID and C.B-17 mice. Reversal by IFN-gamma. *J. Immunol.* 152. 1883–1887 (1994)

130. Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tsihritzis T, Farmer H, Ashworth A, Mosialos G: CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF- κ B activation by TNFR family members. *Nature* 424. 793–796 (2003)
131. Urbanik T, Boger RJ, Longerich T, Becker K, Ehrenberg KR, Hövelmeyer N, Hahn M, Schuchmann M, Jäger D, Waisman A, Wörns MA, Schulze-Bergkamen H: Liver specific deletion of CYLDexon7/8 induces severe biliary damage, fibrosis and increases hepatocarcinogenesis in mice. *J. Hepatol.* 57. 995–1003 (2012)
132. Valenzuela J, Schmidt C, Mescher M: The roles of IL-12 in providing a third signal for clonal expansion of naive CD8 T cells. *J. Immunol.* 169. 6842–9 (2002)
133. Varma TK, Toliver-Kinsky TE, Lin CY, Koutrouvelis AP, Nichols JE, Sherwood ER: Cellular mechanisms that cause suppressed gamma interferon secretion in endotoxin-tolerant mice. *Infect. Immun.* 69. 5249–5263 (2001)
134. Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J: *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14. 584–640 (2001)
135. Weber AC, Levison AL, Srivastava SK, Lowder CY: A case of *Listeria monocytogenes* endophthalmitis with recurrent inflammation and novel management. *J. Ophthalmic Inflamm. Infect.* 5. 28 (2015)
136. Wex K, Schmid U, Just S, Wang X, Wurm R, Naumann M, Schlüter D, Nishanth G: Receptor-Interacting Protein Kinase-2 Inhibition by CYLD Impairs Antibacterial Immune Responses in Macrophages. *Front. Immunol.* 6. 1–13 (2015)
137. Wickström SA, Masoumi KC, Khochbin S, Fässler R, Massoumi R: CYLD negatively regulates cell-cycle progression by inactivating HDAC6 and increasing the levels of acetylated tubulin. *EMBO J.* 29. 131–144 (2010)
138. Wright A, Reiley WW, Chang M, Jin W, Lee AJ, Zhang M, Sun S-C: Regulation of early wave of germ cell apoptosis and spermatogenesis by deubiquitinating enzyme CYLD. *Dev. Cell* 13. 705–716 (2007)
139. Wu W, Zhu H, Fu Y, Shen W, Xu J, Miao K, Hong M, Xu W, Liu P, Li J: Clinical significance of down-regulated cylindromatosis gene in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 55. 588–594 (2014)

140. Wurm R, Just S, Wang X, Wex K, Schmid U, Blanchard N, Waisman A, Schild H-J, Deckert M, Naumann M, Schlüter D, Nishanth G: Protective dendritic cell responses against listeriosis induced by the short form of the deubiquitinating enzyme CYLD are inhibited by full-length CYLD. *Eur. J. Immunol.* 45. 1366–1376 (2015)

141. Yoshida H, Jono H, Kai H, Li J-D: The tumor suppressor cylindromatosis (CYLD) acts as a negative regulator for toll-like receptor 2 signaling via negative cross-talk with TRAF6 AND TRAF7. *J. Biol. Chem.* 280. 41111–41121 (2005)

142. Yoshimura S, Bondeson J, Foxwell BM, Brennan FM, Feldmann M: Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Int. Immunol.* 13. 675–683 (2001)

143. Zabaleta A, D'Avola D, Echeverria I, Llopiz D, Silva L, Villanueva L, Riezu-Boj JJ, Larrea E, Pereboev A, Lasarte JJ, Rodriguez-Lago I, Iñarrairaegui M, Sangro B, Prieto J, Sarobe P: Clinical testing of a dendritic cell targeted therapeutic vaccine in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2. 1–8 (2015)

144. Zanetti M, Castiglioni P, Schoenberger S, Gerlioni M: The role of relB in regulating the adaptive immune response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 987. 249–257 (2003)

145. Zarnegar B, Yamazaki S, He JQ, Cheng G: Control of canonical NF-kappaB activation through the NIK-IKK complex pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105. 3503–3508 (2008)

146. Zhang J, Stirling B, Temmerman ST, Ma CA, Fuss IJ, Derry JMJ, Jain A: Impaired regulation of NF-kappaB and increased susceptibility to colitis-associated tumorigenesis in CYLD-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 116. 3042–3049 (2006)

147. Zhao Y, Ma CA, Wu L, Iwai K, Ashwell JD, Oltz EM, Ballard DW, Jain A: CYLD and the NEMO Zinc Finger Regulate Tumor Necrosis Factor Signaling and Early Embryogenesis. *J. Biol. Chem.* 290. 22076–22084 (2015)

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Pathophysiologie der Listerieninfektion.....	2
Abb. 2 Pathogenese von <i>Listeria monocytogenes</i>	3
Abb. 3 Aktivierung des kanonischen-, des nicht-kanonischen- und des atypischen NF-κB-Signalwegs.....	8
Abb. 4 Schritte der Ubiquitinierung.....	11
Abb. 5 Regulation des NF-κB und MAPK Wegs durch CYLD.....	13
Abb. 6 Westernblotanalyse der sCYLD-Expression bei Listerieninfektion.....	40
Abb. 7 Höhere Überlebensraten bei CD11c Cre Cyld ^{ex7/8 fl/fl} Mäusen nach Listerieninfektion	41
Abb. 8 Bessere Pathogenkontrolle bei CD11c-Cre Cyld ^{ex7/8 fl/fl} Mäusen nach Listerieninfektion	42
Abb. 9 Identische Zahl von Listerien in DCs von CD11c-Cre Cyld ^{ex7/8 fl/fl} und Cyld ^{ex7/8 fl/fl} Mäusen	43
Abb. 10 sCYLD-Überexpression führt zu einer verstärkten Aktivierung des NF-κB Wegs .	45
Abb. 11 Ubiquitinierung von STAT3 ist sCYLD unabhängig.....	46
Abb. 12 Erhöhte Zytokinproduktion durch CD8α ⁺ DCs von CD11c-Cre Cyld ^{ex7/8 fl/fl} Mäusen	48
Abb. 13 Erhöhte Leukozytenzahlen und größeres Organvolumen bei CD11c-Cre Cyld ^{ex7/8 fl/fl} Mäusen	49
Abb. 14 MHC-Klasse-II Expression in Dendritischen Zellen von CD11c-Cre Cyld ^{ex7/8 fl/fl} und Cyld ^{ex7/8 fl/fl} Mäusen	50
Abb. 15 NK-Zellen von CD11c-Cre Cyld ^{ex7/8 fl/fl} Mäusen produzieren mehr IFN-γ.....	51
Abb. 16 Durchflusszytometrische Analyse der NK-Zell Zytotoxizität.....	52
Abb. 17 Durchflusszytometrische Analyse listerienspezifischer CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen .	53
Abb. 18 <i>Ex vivo</i> Antigen-Presentations-Assay	54
Abb. 19 Durchflusszytometrische Analyse des BrdU-Gehalts von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T- Zellen.....	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer für Genotypisierung.....	18
Tabelle 2: Primer für HPRT- Kontroll-PCR.....	18
Tabelle 3: Primer für RT-PCR.....	19
Tabelle 4: Primäre Antikörper für Westernblot und Immunpräzipitation.....	21
Tabelle 5: Sekundäre Antikörper für Westernblot und Immunpräzipitation.....	21
Tabelle 6: Antikörper für Fluoreszenzzytometrie	22
Tabelle 7: Antikörper und Restimulationsbedingungen für Signalmoleküle.....	24

8 Anhang

8.1 Danksagungen

Zuerst möchte ich meinem Betreuer Prof. Schlüter für die Möglichkeit der Promotion über ein so spannendes Thema und seiner Unterstützung in seinem hervorragendem Team danken. Er stand mir immer unterstützend, motivierend und beratend zur Seite. Ein großer Dank gilt auch meinen Betreuern, Dr. Nishanth Gopala sowie Dr. Xuan Nguyen für die hervorragende Betreuung, die Einführung in Arbeitstechniken und Methoden des Labors während meiner Arbeit. Weiterhin danke Ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die schönen sowohl bei der Arbeit als auch in der Freizeit verbrachten Stunden und die gegenseitige Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt unseren medizinisch technischen Assistenten Annette Sohnekind und Nadja Schlüter, sowie Anita Marquardt für ihre Arbeit im Tierlabor.

Ich danke ebenfalls Prof. Ari Waisman, Universitätsklinikum Mainz für die Möglichkeit der Forschung an dem CD11c-Cre Cyld^{ex7/8 fl/fl} Maustyp.

Nicht vergessen ist die herausragende Unterstützung meines Freundes, meiner Eltern und Geschwister und meiner Freunde.

8.2 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Die Beeinflussung der Immunantwort Dendritischer Zellen durch sCYLD bei der murinen Listeriose“ im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene mit Unterstützung durch Prof. Schlüter ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

8.3 Darstellung des Bildungswegs

Persönliche Angaben

Name	Rebecca Isabel Wurm
Geburtsdatum	20.12.1989
Geburtsort	Duisburg
Familienstand	ledig

Ausbildung und Studium

1995-1996	All Saints Benhilton Primary School, Sutton, Surrey, UK
1997-2003	Quentin Blake Europa Schule, Berlin
2003-2008	Werner von Siemens Gymnasium, Berlin
2008-2015	Medizinstudium an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
2010	1. Staatsexamen
2014	2. Staatsexamen
2015	3. Staatsexamen und Approbation als Ärztin

Berufliche Laufbahn

Jan 2016- Jul 2016	Assistenzärztin an der Klinik für Strahlentherapie, Universitätsklinikum Magdeburg
Ab Aug 2016	Assistenzärztin an der Klinik für Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Göttingen

8.4 Publikationen und Kongressbeiträge

Wurm R, Just S, Wang X, Wex K, Schmid U, Blanchard N, Waisman A, Schild H-J, Deckert M, Naumann M, Schlüter D, Nishanth G: Protective dendritic cell responses against listeriosis induced by the short form of the deubiquitinating enzyme CYLD are inhibited by full-length CYLD. *Eur. J. Immunol.* 45. 1366–1376 (2015)

Wex K, Schmid U, Just S, Wang X, Wurm R, Naumann M, Schlüter D, Nishanth G: Receptor-Interacting Protein Kinase-2 Inhibition by CYLD Impairs Antibacterial Immune Responses in Macrophages. *Front. Immunol.* 6. 1–13 (2015)

Wurm R, Nguyen X, Schlüter D: „Upregulation of NFκB by short CYLD protects mice against *Listeria monocytogenes* infection via proinflammatory cytokines“, Vortrag im Rahmen der International Academic and Research Conference 2013, University of Manchester, GB