

Aus dem Institut für Immunologie
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Thomas Brocker

CD40-Expression dendritischer Zellen und deren Rolle bei der Induktion von Toleranz und Immunität

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Ferdinand Simon
aus München
2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Brocker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Marion Subklewe
Prof. Dr. phil. nat. Carolin Daniel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2022

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema **„CD40-Expression dendritischer Zellen und deren Rolle bei der Induktion von Toleranz und Immunität“** selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 17.01.2022

Ferdinand Simon

Diese Arbeit enthält Daten der folgenden Veröffentlichung:

Barthels C, Ogrinc A, Steyer V, Meier S, Simon F, Wimmer M, et al. CD40-signalling abrogates induction of ROR γ mat(+) Treg cells by intestinal CD103(+) DCs and causes fatal colitis. *Nat Commun.* 2017;8:14715, DOI: 10.1038/ncomms14715

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	1. Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
BMDC	Dendritische Zellen aus dem Knochenmark (<i>Bone marrow-derived dendritic cells</i>)
cDC	klassische DC (<i>classical DC</i>)
CD	Oberflächenantigen (<i>Cluster of differentiation</i>)
cDNA	Engl. Complementary DNA
CDP	Common DC progenitor
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CLP	Gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle (<i>Common lymphoid progenitor</i>)
CMP	Gemeinsame myeloide Vorläuferzelle (<i>Common myeloid progenitor</i>)
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESAM	Engl. <i>Endothelial cell-specific adhesion molecule</i>
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FBS	Fötales Kälberserum (fetal bovine serum)
for	Vorwärts (<i>forward</i>)
GM-CSF	Engl. <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HEPES	Engl. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HSC	Hämatopoetische Stammzelle (<i>hematopoetic stem cell</i>)
IFN	Interferon

IL	Interleukin
i.v.	Intravenös
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LMP	Latentes Membranprotein (<i>Latent membrane protein</i>)
LK	Lymphknoten
mAb	Monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MDP	Engl. <i>Macrophage-DC progenitor</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major histocompatibility complex</i>)
min	Minute
mLN	Mesenterischer Lymphknoten (<i>Mesenteric lymph node</i>)
mRNA	Boten-RNA (<i>Messenger RNA</i>)
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
n.s.	Nicht signifikant
PALS	Periarterioläre Lymphozytenscheide
PAMP	Pathogenassoziierte molekulare Muster (<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PMS	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	Mustererkennungsrezeptor (<i>Pattern recognition receptor</i>)
qPCR	Quantitative PCR

Rev	Rückwärts (<i>reverse</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
Rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Reverse Transkription
sec	Sekunde
sLN	Hautlymphknoten (<i>Skin-draining lymph nodes</i>)
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
Th1	T-Helferzelle 1
Th2	T-Helferzelle 2
Th17	T-Helferzelle 17
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>toll-like Receptor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
iTreg	Induzierte regulatorische T-Zelle
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Das Immunsystem der Säugetiere	3
2.2	Dendritische Zellen	4
2.2.1	Entwicklung dendritischer Zellen	5
2.2.2	Untergruppen dendritischer Zellen.....	6
2.2.2.1	CD8 ⁺ dendritische Zellen	6
2.2.2.2	CD11b ⁺ dendritische Zellen.....	6
2.3	Reifung dendritischer Zellen und ihre Rolle bei der Induktion von Toleranz und Immunität.....	7
2.3.1	Mechanismen der Selbst-Toleranz	8
2.3.1.1	Zentrale Toleranz.....	8
2.3.1.2	Periphere Toleranz	9
2.3.2	Autoimmunität	9
2.3.3	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	10
2.3.4	CD40 auf dendritischen Zellen	13
2.3.5	Das DC-LMP1/CD40-Mausmodell.....	14
2.4	Zielsetzung der Arbeit.....	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Material	17
3.1.1	Antikörper	17
3.1.2	Chemikalien	18
3.1.3	Geräte	18
3.1.4	Pufferlösungen und Medien.....	19
3.1.5	Mausstämme	20
3.1.6	Peptide und Oligonukleotide.....	21
3.1.7	Verbrauchsmaterialien	21
3.2	Methoden.....	22
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	22
3.2.1.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	22
3.2.1.2	Isolierung von RNA	22
3.2.1.3	Messung von RNA-Konzentrationen	22
3.2.1.4	Genexpressionsanalyse (Microarray).....	23

3.2.1.5	Synthese von komplementärer DNA (cDNA).....	23
3.2.1.6	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	24
3.2.1.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
3.2.2	Zell- und immunbiologische Methoden.....	27
3.2.2.1	Durchflusszytometrie – Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) 27	
3.2.2.2	Magnetische Zellseparation (MACS).....	28
3.2.2.3	Bestimmung von Zellzahlen.....	29
3.2.2.4	Gewinnung von Blut und Organen der Mäuse.....	29
3.2.2.5	Zellkultur	31
3.2.2.6	Adoptiver Zelltransfer	31
3.2.2.7	In vitro T-Zell-Restimulation	32
3.2.2.8	Depletion der Darmflora.....	32
3.2.3	Statistische Analyse.....	33
4	Ergebnisse.....	34
4.1	DC-LMP1/CD40-Mäuse erkranken schwer	34
4.2	Adoptiver Zelltransfer von CD8 ⁺ P14-Zellen in DC-LMP1/CD40-Mäuse	34
4.3	Adoptiver Zelltransfer von CD4 ⁺ SMARTA-Zellen in DC-LMP1/CD40-Mäusen mit depletierter Darmflora	38
4.4	Th1- und Th17-Zellen als Effektorzellen bei der Entstehung der Colitis in DC-LMP1/CD40-Mäusen	41
4.5	Genexpressionsanalyse in BMDC.....	44
4.5.1	Genexpressionsanalyse.....	44
4.5.2	Bestätigung der Ergebnisse mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion	46
5	Diskussion.....	47
5.1	Erhaltenes Potenzial der Toleranzinduktion durch reduzierte Proliferation von CD8 ⁺ T-Zellen in DC-LMP1/CD40-Mäusen	48
5.2	Keine Krankheitsentstehung und keine verstärkte Proliferation CD4-positiver Zellen bei depletierter Darmflora von DC-LMP1/CD40-Mäusen.....	49
5.3	Colitis-Entstehung in DC-LMP1/CD40-Mäusen.....	50
5.4	Änderung der Genexpression in BMDC von DC-LMP1/CD40 Mäusen.....	51
5.4.1	Zusammenfassende Beurteilung der Genexpressionsanalyse	55
5.5	Schlussfolgerungen und Ausblick	56
6	Literaturverzeichnis.....	59
7	Danksagung.....	72

1 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC) gelten als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Als wichtige antigenpräsentierende Zellen treten sie mit T-Zellen in Kontakt und haben eine Schlüsselrolle bei der Induktion von Toleranz und Immunität. Unter normalen Bedingungen wird im Körper Selbstantigen als solches erkannt, was zur Induktion von Toleranz führt. Körperfremde Strukturen, bzw. Pathogene hingegen lösen eine Immunreaktion aus. Ungleichgewichte in diesem System können dazu führen, dass sich das Immunsystem gegen körpereigene Strukturen richtet, also Autoimmunität entsteht. Besonders an Körperoberflächen wie dem Darm kommt diesem System eine wichtige Bedeutung zu, da hier kommensale Bakterien toleriert werden müssen. Das Potenzial von DC, Toleranz oder Immunität zu initiieren, hängt von ihrem Reifezustand ab. Vereinfacht gesagt induzieren unreife DC Toleranz und reife DC Immunität.

Um die Mechanismen, die an der Induktion von Toleranz und Immunität beteiligt sind, weiter zu untersuchen, generierten wir transgene Mäuse, in denen DC ein konstitutives CD40-Signal erhalten. Das Mausmodell wird in der vorliegenden Arbeit als DC-LMP1/CD40 bezeichnet. Für CD40 konnte zuvor bereits *in vitro* und *in vivo* durch Verabreichung von monoklonalen CD40-Antikörpern (mAb) gezeigt werden, dass ein solches Signal bei DC eine unvollständige Reifung bewirkt. Ohne einen zusätzlichen mikrobiellen Stimulus kommt es zu einer unzureichenden Aktivierung von T-Zellen. Unser Mausmodell ermöglichte es uns, die Effekte von CD40 auf DC ohne die potenziellen Nebeneffekte durch die Verabreichung des mAb auf andere Zellen zu beobachten.

In den zuvor durchgeführten Versuchen unserer Arbeitsgruppe zeigte sich in den transgenen Mäusen eine ausgeprägte Colitis, die zu Gewichtsverlust und frühem Tod führte. Eine Subpopulation von DC, CD103⁺ DC, in der Lamina propria und im mesenterischen Lymphknoten war deutlich reduziert. Das konstitutive CD40-Signal führte dazu, dass CD103⁺ DC die Fähigkeit verloren, in der Peripherie aus naiven T-Zellen regulatorische T-Zellen zu induzieren, was zum Zusammenbruch der Immuntoleranz im Darm gegenüber kommensalen Bakterien und zur Entstehung der Colitis führte. Die Entstehung der Krankheit war dabei abhängig von der Darmflora, sowie der Präsenz von T- und/oder B-Zellen.

In dieser Arbeit wurde zunächst ein Augenmerk auf das Verhalten von T-Zellen in DC-LMP1/CD40 Mäusen, deren Expansion und deren Entwicklung von Effektorfunktionen gelegt. Besonders in den mesenterischen Lymphknoten zeigte sich eine deutliche Erhöhung von Th1- und Th17-Zellen. Beides sind Zelltypen, denen eine Rolle bei der Entstehung von Colitis zugeschrieben wird. In Transferexperimenten mit CD8⁺ T-Zellen zeigte sich jedoch das erhaltene Potenzial von DC, Toleranz zu induzieren. Man kann also davon ausgehen, dass CD40-Signale alleine zu einer unzureichenden Reifung von DC führen. In Kombination mit einem zusätzlichen Stimulus, der zum Beispiel von der Darmflora ausgeht, kommt es aber zur überschießenden Aktivierung von T-Zellen und Autoimmunität.

Eine durchgeführte Genexpressionsanalyse von *in vitro* aus Knochenmarksvorläuferzellen differenzierten DC zeigte Veränderungen in der Expression von Genen, die zum einen die inflammatorischen Vorgänge in den transgenen Mäusen verstärken mögen, zum anderen als kompensatorischer Versuch der Gegenregulation gewertet werden können.

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem der Säugetiere

Die Aufgabe des Immunsystems in mehrzelligen Organismen ist es, Schutz vor Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, pathogenen Pilzen und Parasiten zu gewähren. Dabei kann man zwischen zwei gleichsam wichtigen Teilen unterscheiden: dem angeborenen und dem erworbenen (adaptiven) Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem dient dabei der ersten schnellen Abwehr von pathogenen Keimen. Dazu tragen sowohl physische als auch chemische Barrieren wie z.B. die Haut, Schleimhäute, Speichel, Tränenflüssigkeit, Magensäure, als auch Immunzellen, wie Phagozyten und natürliche Killerzellen (NK) bei. Darüber hinaus gibt es physiologische Abwehrsysteme wie das Komplementsystem. Gelingt es einem Erreger, die mechanischen Barrieren des Körpers zu überwinden und in den Körper einzudringen, sind Makrophagen und NK-Zellen von großer Bedeutung. Diese können über verschiedene Rezeptoren, wie die Toll-ähnlichen-Rezeptoren (TLR), Erreger erkennen und phagozytieren. Dabei werden die Makrophagen selbst aktiviert, was zu einer lokalen Entzündungsreaktion, der Aktivierung des Komplementsystems und Anlockung von anderen Entzündungszellen führt. All diese Mechanismen laufen im Körper mit einer eher geringen Spezifität für den Erreger ab. Reichen diese nicht aus, übernimmt das erworbene Immunsystem die körpereigene Abwehr.

Das erworbene Immunsystem zeigt hingegen eine klare Spezifität für den Erreger und wird dabei erst mit einiger Verzögerung wirksam. Es besteht aus B- und T-Zellen, die eine humorale (antikörpervermittelte) und zellvermittelte Abwehr auslösen. Die Effektorzellen des erworbenen Immunsystems müssen dabei erst induziert werden. Dabei sind antigenpräsentierende Zellen (APC), wie Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen (DC) von entscheidender Bedeutung. Diese präsentieren über MHC-Moleküle Antigen von Pathogenen an $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. Durch Ausschüttung verschiedener Zytokine, sowie die Bindung von T-Zellrezeptor und verschiedenen Co-Rezeptoren können T-Zellen ihre Effektorfunktionen initiieren und damit eine spezifische Immunabwehr bewirken (zellvermittelte Immunität). Die humorale Abwehr wird über B-Zellen, die Antikörper gegen extrazelluläre Erreger bilden, ausgelöst. Durch die Bildung von Gedächtniszellen kann das erworbene Immunsystem bei erneuter Infektion mit dem gleichen Erreger

wesentlich schneller reagieren, als bei erstmaligem Kontakt. Dieses Phänomen wird als immunologisches Gedächtnis bezeichnet.

Neben der Beseitigung von Pathogenen ist es eine wesentliche Aufgabe des Immunsystems zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen und Antigenen unterscheiden zu können. Unter physiologischen Bedingungen ist das Immunsystem in der Lage, körpereigenes Gewebe und auch kommensale Bakterien zu tolerieren. Dies bezeichnet man als Selbsttoleranz. Wird dieser Zustand gestört, kann dies Autoimmunität zur Folge haben. Dabei richtet sich das Immunsystem gegen körpereigene Strukturen. Es gibt eine Vielzahl an Autoimmunerkrankungen, die dadurch bedingt sein können.

2.2 Dendritische Zellen

Wie bereits erwähnt sind antigenpräsentierende Zellen von enormer Bedeutung für das Immunsystem. Sie dienen gewissermaßen als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Dabei ist ihre wesentliche Aufgabe die Initiation und Kontrolle der erworbenen Immunabwehr. Dies geschieht durch die Aufnahme und die anschließende Präsentation von Antigenen über MHC-Moleküle, welche so von anderen Zellen des Immunsystems erkannt werden können, sowie durch die adäquate Expression von kostimulatorischen und koinhibitorischen Molekülen. Dabei sind DC durch ihre konstitutive MHC-II-Expression besonders effektiv (1). Darüber hinaus exprimieren DC in der Regel CD11c. DC wurden 1973 erstmals von Steinman und Cohn beschrieben (2, 3). Sie kommen im Gewebe in unreifer Form vor, erkennen Pathogene über Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors* PRR) und nehmen Antigen über Phagozytose, Endozytose und Pinozytose auf. Anschließend wandern DC in die lokalen Lymphknoten, wo sie über den MHC-II-Komplex und die kostimulatorischen B7-Proteine (CD80 und CD86) und CD40, sowie verschiedene Adhäsionsmoleküle in Kontakt mit naiven CD4⁺ T-Zellen treten, deren T-Zell-Rezeptor das präsentierte Antigen erkennt, und diese aktivieren.

DC sind auch in der Lage über die sogenannte Kreuzpräsentation (Cross-presentation) extrazelluläres Antigen über MHC-I-Komplexe CD8⁺ (zytotoxischen) T-Zellen zu präsentieren (4, 5). Dieser Vorgang ist entscheidend für die Immunität gegen Viren und Krebs (6).

2.2.1 Entwicklung dendritischer Zellen

Nach der Identifizierung von DC in lymphatischen Organen konnten bei Langerhanszellen (LC), erstmals 1868 von Paul Langerhans beschrieben, zahlreiche gemeinsame Eigenschaften mit DC festgestellt werden (7). Dies führte zu der Annahme, es könnten mehrere Untergruppen von DC existieren. Es folgten zahlreiche Veröffentlichungen, in denen Zellen mit ähnlichem Phänotyp beschrieben wurden, welche sich im nicht-lymphatischen Gewebe aufhalten, Antigen aufnehmen und anschließend in die lymphatischen Organe wandern, um dort T-Zellen ihr aufgenommenes Antigen zu präsentieren. So entstand das heute anerkannte Konzept, das DC als Wächter des Immunsystems beschreibt, deren Aufgabe es ist, das Gewebe zu durchsuchen und eine Antwort des erworbenen Immunsystems auf periphere Stimuli zu initiieren (8).

Von den von Steinman beschriebenen klassischen DC (cDC) (2) unterscheidet man noch eine weitere Gruppe von DC. Die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC). Namensgebend ist ihre plasmazellähnliche Struktur. pDC zeichnen sich durch eine längere Lebensdauer als die relativ kurzlebigen cDC und durch hohe Interferon-I-Expression als Antwort auf virale Infektionen aus (9, 10). In dieser Arbeit werden vor allem cDC beschrieben und ihre Rolle bei der Induktion von Immunität und Toleranz.

Wie alle Blutzellen stammen auch DC von einer gemeinsamen hämatopoetischen Stammzelle (HSC) des Knochenmarks ab. Ein sehr früher Schritt in der Hämatopoese ist die Aufteilung in die lymphoide und die myeloide Entwicklungsreihe. Es konnte gezeigt werden, dass Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Megakaryozyten, Erythrozyten (11) und auch die meisten DC von einer gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle (CMP) abstammen (12).

CMP differenzieren zu Monozyten/Makrophagen- und DC-Vorläuferzellen (MDP), die sich zu Monozyten oder zur gemeinsamen DC-Vorläuferzelle (CDP) weiterentwickeln. CDP haben das Potenzial, entweder zu plasmazytoiden DC oder den Vorläuferzellen von cDC (pre-cDC) zu differenzieren. Dabei sind CDP aber nicht mehr in der Lage, Monozyten hervorzubringen. Pre-cDC sind die Vorläuferzellen zahlreicher Untergruppen dendritischer Zellen, die im nächsten Kapitel zum Teil genauer beschrieben werden. Sie halten sich nur für sehr kurze Zeit im Blut auf und wandern rasch in die peripheren lymphatischen Organe und in das nicht lymphatische Gewebe, wo sie zu DC differenzieren (13).

Da es sich wie bereits beschrieben bei DC um eine sehr heterogene Zelllinie handelt, kommt es regelmäßig zu Änderungen und Anpassungen dieser Einteilung.

2.2.2 Untergruppen dendritischer Zellen

Aufgrund der Heterogenität von DC können sie nach verschiedensten Kriterien klassifiziert werden. So können Monozyten-unabhängige DC, welche für ihre Entwicklung Flt-3L benötigen, von Monozyten-abstammenden DC, die M-CSF benötigen, unterschieden werden (14). Weiter können klassische DC (cDC) von plasmazytoiden DC (pDC) unterschieden werden, sowie die DC des lymphatischen und des nicht-lymphatischen Gewebes (15).

Da in dieser Arbeit der Fokus auf cDC liegt, werden im Folgenden zwei wichtige Untergruppen von cDC beschrieben: $CD8^+/CD103^+$ DC und $CD11b^+$ DC.

2.2.2.1 $CD8^+$ dendritische Zellen

$CD8^+$ DC wurden als erste Untergruppe von DC in der Maus beschrieben (16). Das Äquivalent im nicht-lymphatischen Gewebe exprimiert anstelle von $CD8^+CD103^+$ (17, 18). Die Gruppe von $CD8^+/CD103^+$ DC wird durch die Expression von Xcr1, die beiden gemeinsam ist (sowohl im lymphatischen, als auch nicht-lymphatischen Gewebe), charakterisiert. Xcr1 ist ein Zytokin-Rezeptor und wird von lymphatischen und nicht-lymphatischen $CD8^+/CD103^+$ DC exprimiert (19, 20) und kann daher als zuverlässiger Marker dieser Zellgruppe dienen. $CD8^+/CD103^+$ DC sind effektiv in der Kreuzpräsentation über MHC-I-Moleküle. Dies wurde sowohl für DC in der Milz (21), als auch für DC in nicht-lymphatischen Geweben gezeigt (22). Auf Stimulation durch TLR-Liganden reagieren $CD8^+$ DC mit der Produktion von hohen Mengen an IL12p70 (23). IL12p70 bewirkt als Zytokin zum einen eine Aktivierung von natürlichen Killerzellen, zum anderen ist es an der Induktion von Th1-Zellen aus $CD4^+$ T-Zellen beteiligt (24, 25).

2.2.2.2 $CD11b^+$ dendritische Zellen

$CD11b^+$ DC sind in allen lymphatischen Organen außer im Thymus die vorherrschende DC-Subpopulation (26). In der Milz sind $CD11b^+$ DC heterogen und können in zwei Gruppen eingeteilt werden, welche sich durch unterschiedliche ESAM-Expression auszeichnen. $ESAM^{hi}$ DC exprimieren höhere Level an CD4, CD11c und Flt3 und

niedrigere Level an Csf-1R, Csf-3R und CCR2 als ESAM^{lo} DC. Dabei stammten ESAM^{hi} DC von DC-Vorläuferzellen ab und ihre Entwicklung ist dabei von Notch2 (neurogenic locus notch homolog protein 2) abhängig. Bei ESAM^{lo} DC geht man davon aus, dass sie von zirkulierenden Monozyten abstammen (27).

Im Gegensatz zu CD8⁺ DC sind CD11b⁺ DC nicht befähigt zur Kreuzpräsentation über MHC-I-Moleküle, produzieren aber mehr IL-6 und IL-23 und sind daher besser ausgerüstet, CD4-Antworten über MHC-II assoziierte Antigenpräsentation auszulösen (28-30).

Neuere Nomenklaturen bezeichnen die beiden DC-Untergruppen als cDC1 (CD8⁺/CD103⁺ cDC) und cDC2 (CD11b⁺ cDC) (31, 32).

2.3 Reifung dendritischer Zellen und ihre Rolle bei der Induktion von Toleranz und Immunität

Nachdem T- und B-Zellen den Mechanismen der zentralen Toleranzinduktion unterzogen wurden, gelangen sie als naive Zellen in die Peripherie. Dort können sie nach Aktivierung durch APC effektiv Pathogene bekämpfen.

DC sind entscheidend an der Induktion von Immunität und Toleranz bzw. deren Regulation beteiligt. Wie bereits erwähnt haben DC zahlreiche Eigenschaften, die sie dazu befähigen, Immunantworten einzuleiten. Dabei ist vor allem ihre Plastizität entscheidend. Vereinfacht dargestellt sind DC entweder unreif, oder nach Kontakt mit einem Antigen reif.

Von DC gehen drei verschiedene Signale für die klonale Expansion und Differenzierung von naiven T-Zellen aus. Signal 1 umfasst die Interaktion eines mit Peptid beladenen MHC-Komplexes mit dem passenden T-Zell-Rezeptor (TCR). Diese Verbindung reicht allerdings noch nicht für die Aktivierung der T-Zelle in eine Effektor-T-Zelle aus. Hierfür sind noch zwei weitere Signale nötig. Die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf DC interagieren mit CD28 auf T-Zellen und fördern so das Überleben und die Expansion von T-Zellen (Signal 2). Die T-Zell-Differenzierung in verschiedene Effektorzellen wird dann durch das Ausschütten bestimmter Zytokine, wie z.B. IL-12, gesteuert (Signal 3).

2.3.1 Mechanismen der Selbst-Toleranz

Unterschiedliche immunologische Kontrollmechanismen gewährleisten die sogenannte Selbst-Toleranz. Unter physiologischen Bedingungen richten sich Immunzellen nicht gegen körpereigene Strukturen. Das „Selbst“ wird also toleriert. Dabei kann man im Grunde zwei wichtige Mechanismen nennen, welche gemeinsam zur Selbsttoleranz führen: Die zentrale und die periphere Toleranz.

2.3.1.1 Zentrale Toleranz

Die Mechanismen der zentralen Toleranz spielen sich in den primären Immunorganen Thymus und Knochenmark ab. Dabei werden T-Zellen im Thymus und B-Zellen im Knochenmark selektiert.

T-Zellen entstehen im Thymus aus Vorläuferzellen des Knochenmarks durch somatische Rekombination. Die Reifung im Thymus ist auch der Grund für den Namen Thymus-abhängige (T-) Lymphozyten oder T-Zellen. Um zu verhindern, dass die unreifen Thymozyten, sobald sie den Thymus verlassen, körpereigenes Gewebe angreifen, werden sie verschiedenen „Tests“ zur Etablierung der Toleranz unterzogen.

T-Zellen, die hochaffine Rezeptoren für ihnen präsentiertes Selbstantigen besitzen und damit stark mit den MHC-Peptid-Komplexen reagieren, werden in die Apoptose gezwungen oder können in regulatorische T-Zellen (Treg) konvertiert werden (negative Selektion). Es wurde gezeigt, dass DC bei diesen Vorgängen wesentlich beteiligt sind (33, 34).

Die Bedeutung von DC bezüglich der Aufrechterhaltung der zentralen Toleranz wurde durch eine Publikation unterstrichen, in der gezeigt wurde, dass die konstitutive Ablation von DC im Mausmodell dazu führt, dass keine negative Selektion mehr stattfindet und vermehrt autoreaktive T-Zellen in die Peripherie gelangen. In der Folge kommt es zur Autoimmunität (35). Die Ergebnisse der Studie sind allerdings umstritten, da eine andere Arbeitsgruppe unabhängig davon im selben Mausmodell eine normale T-Zell-Entwicklung und Homöostase beschrieb, aber die Entstehung eines myeloproliferativen Syndroms beobachtete (36).

2.3.1.2 Periphere Toleranz

Trotz der negativen Selektion im Thymus gelingt es einer geringen Zahl autoreaktiver T-Zellen in die Peripherie zu gelangen. Um die periphere Immuntoleranz aufrecht zu erhalten, bedarf es also weiterer regulierender Mechanismen. Hierbei spielen DC eine entscheidende Rolle. Selbstantigen kann sowohl von Zellen im peripheren Gewebe über MHC-I-Moleküle, als auch von APC wie DC über MHC-II-Moleküle im lymphatischen Gewebe präsentiert werden. Für eine Immunreaktion bedarf es aber kostimulatorischer Signale. Liegt keine Infektion vor, werden nur sehr wenige kostimulatorischen Moleküle von DC (durch unreife DC) exprimiert. So werden naive T-Zellen, die in der Peripherie Selbstantigen erkennen normalerweise nicht aktiviert, sondern in einen Status getrieben, der als Anergie bezeichnet wird. T-Zellen, die sich in der Anergie befinden, können auch später in Anwesenheit kostimulatorischer Moleküle nicht mehr aktiviert werden (37). Andere T-Zellen, die Selbstpeptid erkennen, werden in die Apoptose getrieben oder in Treg konvertiert. Treg, die in der Peripherie induziert werden, werden auch als induzierte regulatorische T-Zellen bezeichnet (iTreg).

2.3.2 Autoimmunität

Paul Ehrlich formulierte erstmals zu Beginn des 20. Jahrhunderts das Prinzip der Autoimmunität, als er vom „horror autotoxicus“ sprach. Seine Experimente brachten ihn zu der Annahme, das Immunsystem richte sich unter physiologischen Bedingungen nur gegen körperfremde Strukturen. Er beobachtete bei einer Ziege, dass sie durch Verabreichung fremden Ziegenblutes Antikörper gegen die fremden Erythrozyten bildete, nicht aber gegen ihre eigenen Erythrozyten bei der Injektion von zuvor entnommenem Eigenblut.

Bei einer Autoimmunerkrankung kommt es zu einer inadäquaten Reaktion des Immunsystems gegen körpereigenes Gewebe. Dabei läuft die Autoimmunreaktion im Grunde ab wie eine normale Immunreaktion gegen körperfremde Antigene. Wie bereits erwähnt, gibt es verschiedene Mechanismen (zentrale und periphere), durch welche die Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen aufrechterhalten wird. Autoimmunität entsteht, wenn diese Mechanismen zusammenbrechen oder versagen. Unter diesen Bedingungen können autoreaktive B- und T-Zellen aktiviert und zur Proliferation angeregt

werden, sowie die Produktion von Autoantikörpern begünstigt werden. All diese reagieren auf körpereigenes Gewebe und schädigen oder zerstören dieses.

Zu einigen der häufigsten und bekanntesten Autoimmunerkrankungen gehören Morbus Basedow, rheumatoide Arthritis, Hashimoto-Thyreoiditis, Diabetes Mellitus Typ 1, Multiple Sklerose und der systemische Lupus erythematoses. Auch die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa gelten als Autoimmunerkrankungen.

2.3.3 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

In dieser Arbeit wird ein Mausmodell vorgestellt, in dem die Mäuse nach genetischer Veränderung eine Colitis entwickelten, was zu Gedeihstörung und frühem Tod führte (38).

In diesem Zusammenhang soll an dieser Stelle auch auf chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) eingegangen werden.

CED sind rezidivierende oder kontinuierliche entzündliche Erkrankungen des Verdauungstraktes. Sie bilden eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die nach Phänotyp in die Hauptvertreter Morbus Crohn und Colitis ulcerosa unterschieden werden. Neben diesen beiden Erkrankungen gibt es auch chronische Colitiden, die nicht genau klassifizierbar oder zuzuordnen sind (39, 40). Die Prävalenz in Europa und in den USA liegt für die beiden Erkrankungen zwischen 249 und 505 pro 100.000. Dabei sind Prävalenz und Inzidenz in Europa und in den USA steigend (41, 42). Auch die Inzidenz bei Kindern ist steigend (43, 44). Der Beginn der beiden Erkrankungen fällt typischerweise auf die zweite und dritte Lebensdekade (42).

Der Morbus Crohn wurde 1623 erstmals von dem deutschen Chirurgen Wilhelm Fabry beschrieben, später auch vom amerikanischen Arzt Burril B. Crohn und nach diesem benannt (45). Die Colitis ulcerosa wurde erstmals 1859 vom britischen Arzt Sir Samuel Wilks beschrieben.

Der Morbus Crohn kann typischerweise den gesamten Verdauungstrakt vom Mund bis zum Anus befallen, insbesondere sind meist das terminale Ileum und die Perianalregion betroffen. Das Befallsmuster ist dabei diskontinuierlich und betrifft alle Wandschichten des Magendarmtrakts. Durch das transmurale Befallsmuster kommt es im Krankheitsverlauf häufig zur Bildung von Fisteln, Abszessen und Strikturen.

Im Gegensatz dazu ist die Colitis ulcerosa auf den Dickdarm und das terminale Ileum beschränkt. Das Befallsmuster ist hier kontinuierlich, die Entzündung beschränkt sich auf die Darmschleimhaut (Mukosa und Submukosa). Die Symptomatik der beiden Erkrankungen ist dabei vor allem von Durchfällen geprägt, die bei der Colitis ulcerosa im Gegensatz zum Morbus Crohn oft blutig sind. Weitere häufige Symptome sind Bauchschmerzen und Gewichtsverlust, sowie zahlreiche extraintestinale Symptome. Bei Kindern sind Wachstum und Entwicklung beeinträchtigt.

Die häufigsten extraintestinalen Manifestationen sind aphtöse Läsionen der Mundschleimhaut, Erythema nodosum, Episkleritis, Uveitis, Arthritis, ankolysierende Spondylitis, primär sklerosierende Cholangitis und Pyoderma gangraenosum. Diese Manifestationen können bereits vor den ersten Symptomen der jeweiligen CED auftreten (46).

Aktuell gibt es für die beiden Erkrankungen keine kurative Behandlung. Symptome können durch Kortikosteroide und/oder Immunsuppressiva kontrolliert werden. Diätetische Maßnahmen können hilfreich sein, bestimmte Umweltfaktoren zu beseitigen. Dabei ist vor allem die Ernährungstherapie bei Morbus Crohn zu erwähnen, die bei Kindern regelmäßig eine Remission herbeiführt (47, 48). Bei schweren Verläufen werden teilweise chirurgische Eingriffe am Darm notwendig. Nur durch die Proktokolektomie kann die Colitis ulcerosa geheilt werden, mit dem Risiko zahlreicher weiterer Komplikationen.

CED entstehen durch eine überschießende, fortschreitende entzündliche Immunreaktion auf die Darmflora in genetisch anfälligen Individuen (49). Auch wenn die genaue Pathogenese bisher nicht entschlüsselt ist, konnte gezeigt werden, dass sowohl genetische Faktoren, Umweltfaktoren, die Zusammensetzung der Darmflora und verschiedene Immunreaktionen an der Entstehung der beiden Erkrankungen beteiligt sind.

Die Konkordanz bei eineiigen Zwillingen für die Entstehung der Krankheit beträgt beim Morbus Crohn 30-35%, bei der Colitis ulcerosa dagegen nur 10-15%, was darauf schließen lässt, dass nicht-genetische Ursachen bei der Colitis ulcerosa eine größere Rolle spielen (50). In einer großen Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass die Konkordanz bei zweieiigen Zwillingen in beiden Gruppen deutlich niedriger ist, was den Verdacht, das vermehrte Auftreten bei eineiigen Zwillingen könnte durch gemeinsame Umweltfaktoren bedingt sein, entkräftete (51).

Es sind inzwischen zahlreiche Genloci identifiziert worden, die bei der Entstehung von CED eine Rolle zu spielen scheinen (52-55). Dabei sind besonders die proteinkodierenden Varianten der Gene NOD2, IL23R und ATG16L1 hervorzuheben, welche eine große Rolle bei der antibakteriellen Immunantwort spielen (54).

Neben der multifaktoriellen Genese von CED werden auch primäre, monogene Immundefekte als Ursache von CED beschrieben. Diese monogenetischen CED können in verschiedene funktionelle Gruppen eingeteilt werden. Hierbei sind verschiedene Pathomechanismen verantwortlich, die teilweise sich überschneidende Signalwege haben. So sind Defekte der epithelialen Barriere, Dysfunktion von Phagozyten, hyper- und autoinflammatorische Syndrome, Aktivierungs- und/oder Selektionsdefekte von T- und B-Zellen, Defekte der regulatorischen T-Zellen (Treg), Defekte im Interleukin-10-Signalweg und sonstige Defekte, die noch nicht zugeordnet werden können, die Folge (56).

Es sind aktuell mehr als 60 monogenetische Defekte beschrieben, die man mit der Entstehung von chronischen Darmentzündungen in Zusammenhang bringt (57-59). Dabei sind monogene CED mit einer Prävalenz von 1:10.000 bis 1:100.000 seltene Erkrankungen. Bei Diagnose einer CED in den ersten 6 Lebensjahren ist das Risiko für einen primären Immundefekt besonders hoch (60, 61).

Eine Erstmanifestation einer CED in den ersten drei Lebensmonaten sollte den Verdacht auf einen Defekt im IL-10-Signalweg lenken (59). Hierbei können sowohl Mutationen im IL-10-Rezeptor, als auch im IL-10-Zytokin verantwortlich sein (62). IL-10 ist ein antiinflammatorisches, immunsuppressives Zytokin, welches seine Effekte auf verschiedene Immunzellen ausübt und dabei überschießende Immunreaktionen abmildert oder verhindert (63). Es wird von einer Vielzahl von Zelltypen gebildet, dabei ist jedoch vor allem die Bedeutung von IL-10 als Mediator der Immunsuppression durch FOXP3⁺ und FOXP3⁻ Treg hervorzuheben (64).

Auch der kostimulatorische CD40-CD40L-Signalweg, der im Mausmodell dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung ist, spielt eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentstehung von CED. So konnte in den Mukosazellen, Endothelzellen und DC von Patienten mit Morbus Crohn eine Überexpression von CD40 festgestellt werden (65, 66). Die Behandlung mit monoklonalen CD40-Antikörpern zeigte sich in einer Studie als vielversprechender therapeutischer Angriffspunkt mit guten Remissionsraten (67).

2.3.4 CD40 auf dendritischen Zellen

CD40 ist ein Transmembran-Glykoprotein aus der Tumornekrosefaktorrezeptor-Superfamilie 5 mit einer molekularen Masse von 48 kDa. Die Erstbeschreibung erfolgte auf B-Lymphozyten, jedoch wird es auch auf anderen hämatopoetischen Zellen wie DC, Monozyten, sowie nicht hämatopoetischen Zellen wie epithelialen und endothelialen Zellen exprimiert.

Durch die Bindung des Liganden CD154 bzw. CD40L kommt es zur Reifung der entsprechenden DC und zur Hochregulation von MHC-II-Molekülen und kostimulatorischen Proteinen wie CD80 und CD86 (68-70). Dadurch werden DC zu effektiveren antigenpräsentierenden Zellen und können die Signale 1 und 2 auf Effektorzellen initiieren.

Es wurde gezeigt, dass DC, die über CD40 aktiviert wurden, auch ein Signal 3 durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 bewirken können. Dies wurde sowohl *in vitro* (71), als auch *in vivo* nach Immunisierung mit anti-CD40 monoklonalen Antikörpern (mAb) gezeigt (72, 73). Andere Arbeitsgruppen zeigten auf der anderen Seite, dass CD40-Signale *in vivo* allein eine inkomplette DC-Reifung induzieren und es einer Kombination aus CD40-Signal und TLR-Ligation bedarf um eine komplette Aktivierung der DC zu erreichen (74-76).

Die Ergebnisse dieser Studien müssen kritisch betrachtet werden, da die *in vivo* Applikation von anti-CD40 mAb nicht nur Effekte auf DC hat, sondern auch auf andere Zellen wie z.B. B-Zellen. Nach der Injektion von anti-CD40 mAb *in vivo* wurde eine B-Zell-abhängige entzündliche Lebererkrankung in der Maus beschrieben (77). Hierbei bleibt es unklar, ob die beobachteten Effekte durch die Verabreichung der Antikörper oder zusätzlich durch proinflammatorische Zytokine der entzündeten Leberzellen bedingt sind. Bei den *in vitro* Versuchen muss bedacht werden, dass DC hier im Rahmen der nötigen Stimulation durch Wachstumsfaktoren und Kultivierung in Serum und Plastikschalen weiteren synergistischen Effekten unterliegen.

Da *in vivo* Versuche mit anti-CD40 mAb aufgrund der oben beschriebenen Nebeneffekte nicht gut geeignet sind, entwickelten wir ein Mausmodell, bei dem es zu einer konstitutiven, sterilen CD40-Expression selektiv auf DC kommt.

2.3.5 Das DC-LMP1/CD40-Mausmodell

Zur weiteren Untersuchung der Effekte durch CD40-Signale auf DC dienten uns transgene Mäuse, welche latent membrane protein 1/CD40 (LMP1/CD40) exprimieren. Hierfür diente uns das Modell aus der Arbeitsgruppe von Ursula Zimmer-Strobel (78). Dabei wurde in die Mäuse mittels Knock-in eine STOP-Kassette, die von zwei loxP-Stellen flankiert ist und auf die das Gen für das Fusionsprotein LMP1/CD40 folgt, in die ROSA26-Position inseriert. Die ROSA26-Position zeichnet sich durch eine gleichbleibend starke Transkription von inserierten Genen in allen Entwicklungsstadien und Zelltypen aus (79).

Nun kreuzten wir LMP1/CD40-Mäuse mit CD11c-Cre transgenen Mäusen, welche die Cre-Rekombinase in CD11c⁺ Zellen exprimieren. CD11c kommt fast ausschließlich auf DC und Makrophagen vor (80). Wenn Cre exprimiert wird, wird die STOP-Kassette entfernt und das LMP1/CD40-Transgen gerät nun unter die Kontrolle des stets aktiven ROSA26-Promoters, so dass es in CD11c⁺ Zellen zu einer konstitutiven CD40-Expression kommt (Abbildung 2-1). Der so entstandene Mausstamm, der sowohl ein LMP1/CD40 Allel, als auch ein CD11c-Cre Allel trägt, wird im Folgenden mit DC-LMP1/CD40 bezeichnet.

Das Fusionsprotein LMP1/CD40 besteht aus der Transmembran-Domäne von LMP1 (Aminosäuren 1-187) des Epstein-Barr-Virus (EBV) und dem intrazellulären Teil des humanen CD40 Rezeptors (AS 223-280).

EBV infiziert B-Zellen und kann in ihnen lebenslang persistieren. Darüber hinaus kann es vor allem in immungeschwächten Individuen maligne lymphoproliferative Erkrankungen, wie z.B. das Burkitt-Lymphom auslösen. Um in der Wirtszelle persistieren zu können, exprimiert EBV in der Latenzphase III sechs verschiedene nukleäre Antigene (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C und EBNA-LP) und zwei latente Membranproteine (LMP1 und LMP2A). LMP1 ähnelt dabei funktionell CD40 im Bezug auf die B-Zell-Proliferation und das Zellüberleben. LMP1 besteht aus einem kurzen zytoplasmatischen N-Terminus, aus sechs Transmembrandomänen und aus einem langen zytoplasmatischen C-Terminus. Es ist der entscheidende Faktor für die Immortalisierung von B-Zellen und damit der Tumorentwicklung durch EBV. Über den Transmembrananteil von LMP1 erfolgt das Anheften an andere LMP1-Proteine. So kann es durch die Rekrutierung von TRAF zu einem Liganden-unabhängigen konstitutiven Aktivierungssignal kommen (81). Wie bereits erwähnt ist LMP1 CD40 in seiner Funktion sehr ähnlich. Dies gilt auch für die Aktivierung von NF- κ B, JNK und p38/MAPK (82, 83).

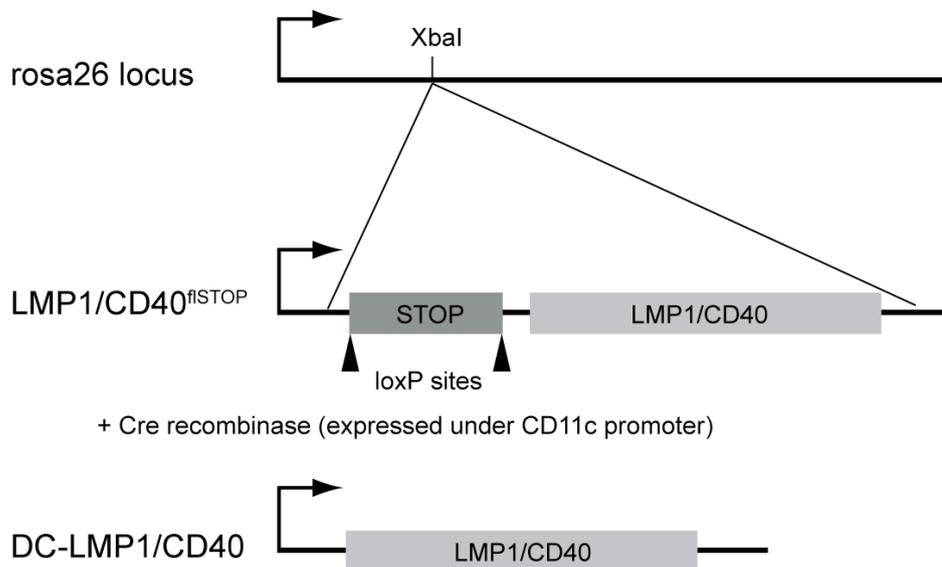


Abb. 2-1 Schematische Darstellung der rosa26-Position in LMP1/CD40 Mäusen und DC-LMP1/CD40 Mäusen. In der Mitte Darstellung der rosa26-Position in LMP1/CD40 Mäusen, unten nach Kreuzung mit CD11c-Cre Mäusen. Abbildung aus (84).

Der intrazelluläre Anteil des humanen CD40-Rezeptors stellt den zweiten Teil des LMP1/CD40-Fusionsproteins dar. Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass der humane CD40-Rezeptor den Phänotyp von CD40-defizienten Mäusen wiederherstellen kann (85).

Um die beiden Moleküle, LMP1 und CD40, zu vergleichen, wurden verschiedene Fusionsproteine aus beiden Molekülen erstellt. Hierbei zeigten sich in den verschiedenen Modellen deutliche Ähnlichkeiten im Bezug auf die Aktivierung von NF- κ B und die Expression von Wachstumsfaktoren *in vitro* (86, 87).

In vivo konnte gezeigt werden, dass die konstitutive B-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD40 zu einem aktivierten Phänotyp, verlängertem Überleben und gesteigerter Proliferation von B-Zellen führte. Hierzu wurde das LMP1/CD40 Fusionsprotein durch CD19-Cre aktiviert. Das konstitutive CD40-Signal führte dabei bei den Mäusen unter anderem zur konstitutiven Aktivierung des nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweges. Die Mäuse entwickelten ab dem 12. Lebensmonat regelmäßig B-Zell-Lymphome, was die Bedeutung von CD40-Signalen für die Proliferation und das Überleben von B-Zellen unterstreicht (78).

2.4 Zielsetzung der Arbeit

DC sind als wichtige Vertreter antigenpräsentierender Zellen dazu befähigt, Toleranz und Immunität zu induzieren. Im unreifen Zustand vermitteln DC dabei Toleranz, im reifen, aktivierten Zustand Immunität. An der Reifung von DC sind verschiedene Moleküle beteiligt. Dazu gehört auch CD40, dessen Einfluss auf die Reifung von DC zuvor nur *in vitro*, bzw. *in vivo* nach Injektion von anti-CD40 mAb untersucht wurde. Dabei wurden sowohl immunstimulatorische, als auch tolerogene Effekte beschrieben. Um den Einfluss eines sterilen CD40-Signals exklusiv auf DC zu untersuchen, entwickelten wir transgene Mäuse, bei denen es zu einer DC-spezifischen Expression des Fusionsproteins LMP1/CD40 kommt, was eine chronische CD40-Stimulation nachahmt. Anhand von T-Zell-Transfermodellen und der Untersuchung des Potentials von T-Zellen in verschiedenen Organen, bestimmte Effektorfunktionen auszuüben, sollen in dieser Arbeit Rückschlüsse auf die Reifungsprozesse von DC gezogen werden. Zur Detektion von Änderungen in der Genexpression von DC in DC-LMP1/CD40-Mäusen führten wir eine Genexpressionsanalyse durch.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

Epitop (Anti-Maus)	Konjugat	Klon	Bezugsquelle
CD4	FITC PE	H129.19 GK1.5	Becton, Dickinson & Co. (BD), Franklin Lakes, NJ, USA
CD8	PerCP PE-Cy7 APC eFluor 780	53-6.7 53-6.7 53-6.7	BD eBioscience, San Diego, CA, USA eBioscience
CD11b	PE	M1/70	BD
CD11c	APC PE-Cy7	N418 HL3	eBioscience BD
CD44	FITC	Pgp-1, Ly24	BD
CD62L	APC	Mel-14	BD
CD90.1	PerCP	OX-7	BD
CD107a	PE	eBio1D4B	eBioscience
CD205	APC	205yekta	eBioscience
CD209	PE	5H10	eBioscience
F4/80	PE	BM8	eBioscience
IFN- γ	APC	XMG1.2	eBioscience
IL-2	PE-Cy7	JES6-5H4	eBioscience
IL-17A	PE	TC11-18H10	BD

MHC-II (I-A/I-E)	FITC, PerCP	M5/114.15.2	eBioscience
MHC-II (I-A ^b)	Biotin		
TNF- α	FITC	MP6-XT22	eBioscience

Tabelle 3-1: Antikörper, die für die Durchflusszytometrie (FACS) verwendet wurden

Für die intrazelluläre Färbung von IFN- γ , IL-2, IL-17A und TNF- α wurde das Cytotfix/Cytoperm Kit (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) verwendet.

Der agonistische anti-CD40-Antikörper (Klon: FGK45.5, Isotyp: Ratte IgG2a) für die Immunisierung wurde von der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland) bezogen.

3.1.2 Chemikalien

Alle Lösungen, Medien und Puffer wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt. Wenn nicht anders vermerkt wurden die Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (St. Louis, MO, USA) im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen. Die Herkunft spezieller Reagenzien ist den entsprechenden Methodenbeschreibungen zu entnehmen.

3.1.3 Geräte

Brutschrank (Hera cell, Heraeus Kendro Laboratory Products, Hanau), Durchflusszytometer (FACSCalibur, FACSCanto II und FACSria, BD), Magnetrührer (Ika Labortechnik, Staufen), Mikrozentrifuge (Kisker Biotech, Steinfurt), PCR-Gerät (T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen), Pipetten (Gilson, Middleton, WI, USA), Pipettierhilfe (Pipetboy, Integra Biosciences, Baar, Schweiz), Präzisionswaage (Kern, Balingen-Frommern), Real-Time-PCR-Gerät (CFX96 Real Time System, BIO-RAD, Hercules, CA, USA), Thermomixer (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg), Tischzentrifuge (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg und Mikro 200, Hettich, Tuttlingen), Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA), Zellzählgerät (Coulter Counter Z2, Beckman Coulter, Krefeld), Zentrifuge (Rotanta 460R, Hettich, Tuttlingen).

Alle anderen Geräte, die verwendet wurden, werden in den jeweiligen Methodenbeschreibungen erwähnt.

3.1.4 Pufferlösungen und Medien

ACK-Puffer	8,29 NH ₄ Cl 1g KHCO ₃ 37,2 mg Na ₂ EDTA H ₂ O ad 1 l pH 7,2-7,4 mit 1 N HCl eingestellt und durch 0,2 µl Filter steril filtriert
PBS	150 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 mit 5 N NaOH eingestellt
FACS Puffer	PBS 2% FBS (v/v) 0,01% NaN ₃ (v/v)
MACS Puffer	Dulbecco's PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 0,5% FBS (v/v) 2 mM EDTA
Zellkulturmedium für DC	RPMI-1640 (PAA) mit Glutamin 5 % FBS (inaktiviert, v/v) 10 mM Hepes 100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

500 mM β-Mercapthoethanol

25 ng/ml GM-CSF

3.1.5 Mausstämme

Alle Mäuse wurden im Tierstall des Instituts für Immunologie der LMU München gehalten. Nachfolgende Mäuse wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

C57BL/6

Der MHC-Haplotyp dieses als Wildtyp-Kontrolle dienenden Mausstamms ist H-2^b.

CD11cCre

CD11c-Cre-Mäuse wurden vom Labor von Boris Reizis zur Verfügung gestellt. Diese Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CD11c-Promoters (80).

DC-LMP1/CD40

DC-LMP1/CD40-Mäuse wurden durch Kreuzung von CD11cCre-Mäusen mit LMP1/CD40-Mäusen (78) generiert. LMP1/CD40 trägt ein Knock-In des LMP1/CD40-Gens, welchem eine loxP-flankierte STOP-Kassette im konstitutiv aktiven ROSA26-Promoter vorausgeht. Durch die Kreuzung mit CD11cCre-Mäusen kommt es zur Entfernung des STOP-Codons in DC11c⁺ Zellen und damit zur konstitutiven Expression von LMP1/CD40 (weitere Beschreibung des Mausmodells siehe Kapitel 2.3.5).

SMARTA-1

SMARTA-1-Mäuse sind transgen für einen TCR, der das Epitop GP61 von LCMV im Kontext von MHCII I-Ab erkennt (88).

P14

Dieser Mausstamm ist transgen für einen TCR, der das Epitop GP33 aus GP 1 von LCMV im Kontext von MHC-I D^b erkennt (89, 90).

3.1.6 Peptide und Oligonukleotide

Die Peptide GP33 aus Glycoprotein 1 (gp33-41, KAVYNFATM) und GP61 (gp61–80, GLNGPDIYKGVYQFKSVEFD) jeweils von LCMV wurden von der Firma PolyPeptide Group (Straßburg, Frankreich) synthetisiert und bezogen.

Alle Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg, Germany) erworben. Diese werden in den jeweiligen Methodenbeschreibungen aufgeführt.

3.1.7 Verbrauchsmaterialien

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden verwendet:

Cell Strainer (Zellsieb) 100 µm Nylon	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Einmalkanülen 0,45 mm x 12 mm	Terumo, Eschborn, Deutschland
Einmalspritzen 1 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
qPCR-Reaktionsgefäße	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
PCR-Reaktionsgefäße	VWR, Radnor, PA, USA
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Plastik-Petrischalen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsröhrchen 5 ml (FACS)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark

Weitere Plastikwaren und Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen Falcon, Becton Dickinson (Franklin Labs. NJ, USA), Nunc (Wiesbaden) und Greiner (Frickenhausen) erworben.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um DNA- und RNA-Fragmente aufzutrennen und zu identifizieren. Dazu wurden Horizontalgele (0,8-2% Agarose (w/v)) auf TAE-Pufferbasis verwendet. Um die DNA-Fragmente später unter UV-Licht (312 nm, Intas, Göttingen) sichtbar zu machen, wurde dem Gel Ethidiumbromid-Lösung (0,5µg/ml) hinzugefügt. Die 100bp oder 1kb Basenpaarleiter (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) diente als Längenstandard. Die Auftrennung der DNA- oder RNA-Fragmente erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 Volt in einer Elektrophoresekammer mit TAE als Laufpuffer. Anschließend wurden die DNA- oder RNA-Fragmente mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

3.2.1.2 Isolierung von RNA

Für die Isolierung von totaler RNA wurde das miRNeasy mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden direkt nach Abschluss der jeweiligen Versuche (MACS von BMDCs oder FACS von Milzzellen) in 700 µl QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) resuspendiert und somit lysiert. Anschließend wurde die RNA-Isolierung nach den genauen Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die RNA wurde in 50 µl RNase freiem Wasser gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA mit einem 1/10 Volumen Natriumacetat und dem 2,5-fachen Volumen 100-prozentigem Ethanol ausgefällt und bei -80°C gelagert.

3.2.1.3 Messung von RNA-Konzentrationen

Zur Messung von RNA-Konzentrationen wurde ein Nanodrop ND-1000 Gerät verwendet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

3.2.1.4 Genexpressionsanalyse (Microarray)

DNA-Microarrays dienen dazu, die RNA-Menge bestimmter Gene zu bestimmen. Hierzu wird zunächst die RNA aus einer bestimmten Zellsuspension isoliert und in einem weiteren Schritt mittels Reverse Transkriptase-Reaktion in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Anschließend wird die cDNA auf industriell gefertigte DNA-Chips aufgebracht, die eine Vielzahl von Genen abbilden. Durch Inkubation mit der fluoreszenzmarkierten DNA auf den Chips können die Stellen mit hybridisierter DNA identifiziert werden. So kann die Genexpression der entsprechenden Zellen, bzw. die Änderung der Genexpression im Vergleich zu einer Kontrollprobe gemessen werden.

Die Microarray-Analyse unserer Proben wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Thorsten Buch (Group of Expression Core Facility, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München) für die Analyse von BMDC über einen Mouse Gene ST Array (Affymetrix, Santa Clara, USA) durchgeführt.

Die Analysen wurden nach den Standards der jeweiligen Labors und unter Einhaltung der Herstellerangaben durchgeführt.

Die Auswertung der Daten wurde von Dr. Tobias Straub (Biomedical Center Molecular Biology, LMU, Planegg-Martinsried) durchgeführt und uns bereitgestellt.

3.2.1.5 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Mit dieser Methode wird Boten-RNA (messenger RNA, mRNA) mit Hilfe von Oligo-d(T)-Primern, zufälligen DNA-Hexameren, und des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) übersetzt. In dieser Arbeit diente die daraus gewonnene cDNA als Ausgangsmaterial für die darauf folgende quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).

Für die cDNA-Synthese wurden für alle Proben eines Experiments gleiche RNA-Mengen verwendet (für BMDCs 1µg). Es wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) verwendet. In einem ersten Schritt wurde mit Hilfe des Kits die genomische DNA aus der Probe entfernt (gDNA Wipeout Buffer). Auch alle weiteren Schritte wurden nach den Angaben des Herstellers ausgeführt. Für die spätere Negativkontrolle in der qPCR wurde zusätzlich eine Reaktion ohne den Zusatz von Reverser Transkriptase durchgeführt, um eine eventuelle Verunreinigung durch genomische DNA in der qPCR auszuschließen.

Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

3.2.1.6 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative PCR dient dazu, die Menge einer bestimmten DNA-Sequenz in einer Probe zu bestimmen. Wir wählten hierfür ein RT-qPCR-System, basierend auf einem 5'-Nuklease Test (Taqman assay). Die zuvor isolierte RNA, welche im Weiteren in cDNA transkribiert wurde, wurde nun jeweils mit Hilfe zweier flankierender Primer amplifiziert und quantifiziert. Hierfür wurde das LightCycler 480 Probes Master kit (Roche, Basel, Schweiz), sowie das CFX96 Real Time System (BIO-RAD) verwendet. Die verwendeten Primer sind Tabelle 3-2 zu entnehmen.

Im Zuge der Polymerisation der Primer an das cDNA-Fragment wird Fluoreszenz eines an die Sonde gekoppelten Fluorochromes ermöglicht, welche dann durch das Gerät detektiert wird. Auf diese Art kann die Menge an DNA in Relation zu einem Kontrollgen quantifiziert werden. Als zusätzliche Kontrolle diente uns, wie bereits weiter oben beschrieben, jeweils ein zusätzlicher Reaktionsansatz jeder RNA-Probe ohne reverser Transkriptase, um Verunreinigungen durch genomische DNA in der qPCR auszuschließen.

Die Expressionslevel wurden auf Ubiquitin normiert und die relative Quantifizierung wurde mit der $\Delta\Delta CT$ -Methode berechnet (91).

Alle Arbeitsschritte wurden nach Vorgabe der jeweiligen Hersteller durchgeführt.

Gen	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Probe #
C1qc	5'-TTAGGCCTGAAGTCCCT TACAC-3'	5'-GCAGCAGGCAAAGTC CAC-3'	75
Card9	5'-GCTCTCACAAGACCCTG AGC-3'	5'-GCTTCACCCGGAAG CTCT-3'	67
CD205	5'-CTCACGTGGCTATGCAA GAG-3'	5'-GGATGGCTATGCCTGT GTAGT-3'	6
CD209a	5'-ACCAAGAACTGACCCA GTTGA-3'	5'-CTTGGAAGTGCGTCCAG TC-3'	51
CD209c	5'-CCCAACTAGTGGTTATC AAAAGTG-3'	5'-TCCAGGCATAGCCTTT CTCT-3'	84

Chi3l3	5'-AAGAACAACACTGAGCTAAA AACTCTCCT-3'	5'-GAGACCATGGCACTGA ACG-3'	88
Fcrls	5'-GCCTTTGATTGTGGACA TGA-3'	5'-GATCTTCAGAAAGTGC TGGGTAA-3'	67
Gfra2	5'-TTTAACATGATCTTGGC AAACG-3'	5'-AGCGGAGGGTTTCGTCT AA-3'	34
H2-M2	5'-GACAGTGGGAAATGAG ACTCTACTG-3'	5'-CATGATGATGTCAGAAG GGTAGA-3'	81
IL-12p35	5'-CCAGGTGTCTTAGCCA GTCC-3'	5'-GCAGTGCAGGAATAA TGTTTCA-3'	62
IL-12p40	5'-GCGCAAGAAAGAAAA GA TGAA-3'	5'-TTGCATTGGACTTCG GTAGA-3'	82
Inhba	5'-ATCATCACCTTTGCCGA GTC-3'	5'-TCACTGCCTTCCTTGGAA AAT-3'	72
Jag1	5'-TGGCCGAGGTCCTAC ACTT-3'	5'-GCCTTTTCAATTATGCTA TCAGG-3'	22
Mapk14	5'-GACCTTCTCATAGATGA GTGGAAGA-3'	5'-CAGGACTCCATTTCTTCT TGGT-3'	77
Nfkbia	5'-ACGAGCAAATGGTGAA GGAG-3'	5'-ATGATTGCCAAGTGCAG GA -3'	38
Nlrp1a	5'-GTGATAGCCAGGCCCTA CTG-3'	5'-TTGAGCAGCCATCCTAC CAT-3'	84
Notch1	5'-CTGGACCCCATGGACA TC-3'	5'-AGGATGACTGCACACAT TGC-3'	80
Plcb4	5'-TACCTGGGAGGATTCTC GAC-3'	5'-AGGGAGGTCTACCCGAT CAA-3'	64
Slc1a2	5'-AGGACGGGATGAACGTC TTA-3'	5'-CATCAGCTTGGCCTGTT CA-3'	60
UBC	5'-GACCAGCAGAGGCTGAT CTT-3'	5'-CCTCTGAGGCGAAGGAC TAA-3'	11

Tabelle 3-2 Primer und Proben für die quantitative PCR

3.2.1.7 **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Mit dieser Methode wurden DNA-Sequenzen aus CD11c-Cre und DC-LMP1/CD40^{flSTOP} Mäusen amplifiziert. Die dafür benötigte DNA wurde aus den Schwanzspitzen der Mäuse gewonnen.

Hierfür wurden 2-5 mm der Schwanzspitze abgeschnitten, in 50 μ l 1x Gitocher Puffer gegeben und für 6 Stunden bei 55°C inkubiert. Proteinase K wurde bei 95°C über 5 Minuten inaktiviert.

Für die PCR werden spezifische Primer, die die interessierende Region flankieren, benutzt. Durch mehrere, temperaturabhängige und aufeinander folgende Denaturierungs-, Primeranlagerungs-, und Polymerisationsschritte wird das gewünschte DNA-Fragment exponentiell vervielfältigt. Die DNA-Polymerisation erfolgt durch eine hitzestabile DNA-Polymerase.

Primer:

CD11c-Cre for: ACTTGGCAGCTGTCTCCAAG

Cre-ORF rev: GCGAACATCTTCAGGTTCTG

LMP1 for: AGGAGCCCTCCTTGTCCTCTA

CD40 rev: CTGAGATGCGACTCTCTTTGCCAT

Reaktionsbeschreibung:

1 μ l der verdauten Schwanzspitze

2.5 μ l Primer for (10 pmol/ μ l)

2.5 μ l Primer rev (10 pmol/ μ l) 12.5 μ l ReddyMix PCR Master Mix (Abgene, Epsom, UK)

6.5 μ l H₂O

Die PCR-Reaktionen wurden mit einem T3 Thermocycler (Biometra) durchgeführt mit dem folgenden Programm:

CD11c-Cre:

Schritt 1: 95°C 5 min

- Schritt 2: 95°C 30 sec
- Schritt 3: 63°C 30 sec
- Schritt 4: 72°C 30 sec zurück zu Schritt 2 (30 Zyklen)
- Schritt 5: 72°C 10 min
- Schritt 6: 4°C ∞

LMP1/CD40:

- Schritt 1: 94°C 5 min
- Schritt 2: 94°C 45 sec
- Schritt 3: 55°C 45 sec
- Schritt 4: 72°C 1 min 15 sec zurück zu Schritt 2 (31 Zyklen)
- Schritt 5: 72°C 10 min
- Schritt: 4°C ∞

3.2.2 Zell- und immunbiologische Methoden

3.2.2.1 Durchflusszytometrie – Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)

Mit einem FACS Gerät (FACS) lassen sich Größe, Granularität, Oberflächeneigenschaften, sowie intrazelluläre Zusammensetzung einer Zelle unterscheiden. Hierbei werden die zu untersuchenden Zellen einzeln in einem laminaren Flüssigkeitsstrom an einem Laser vorbeigeleitet. Dabei wird Licht beim Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle gestreut. Ein System aus verschiedenen Spiegeln und Filtern trennt die abgehende Strahlung nach ihren Wellenlängenbereichen, die dann über Detektoren registriert wird. Auch unmarkierte Zellen liefern dabei wichtige Informationen über Größe (Vorwärtsstreuung) und Granularität (Seitwärtsstreuung). Auf diese Weise kann man beispielsweise tote Zellen durch ihre geringere Größe und Granulozyten oder Makrophagen durch ihre stärkere Granularität von der Lymphozytenpopulation unterscheiden.

Darüber hinaus lassen sich Oberflächenantigene, aber auch intrazelluläre Antigene mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern oder direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen markieren. Dabei absorbieren die fluoreszenzgekoppelten Antikörper Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittieren Licht einer höheren Wellenlänge. Das so emittierte Licht wird anschließend über Detektoren erfasst, das Signal verstärkt und die Daten verrechnet. Die Daten werden dann üblicherweise entweder über ein Histogramm, bei dem nur eine Fluoreszenz dargestellt wird, oder über ein Punktwolkendiagramm (Dotplot), bei dem zwei verschiedene Fluoreszenzen gegeneinander aufgetragen werden, dargestellt.

Die Messungen wurden an einem FACSCalibur- oder an einem FACSCantoII-Durchflusszytometer (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) vorgenommen. Die Datenaufnahme erfolgte mit CellQuest Software, Version 3.4 bzw. BD FACSDiva Software, Version 2.2 (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA). Für die Datenanalyse wurde die FlowJo-Software (Tree-star, Ashland, OR, USA) verwendet.

Färbemethode:

In einem FACS-Röhrchen wurden 50 µl der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen einer doppelt konzentrierten Antikörperlösung in PBS vermischt und 20 min. bei 4°C abgedunkelt inkubiert. Jeder Antikörper war zuvor für die optimale Verwendung titriert worden. Ungebundene Antikörper wurden dann durch einmaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt. Nach dem letzten Waschschrift verblieben ca. 200 µl Zellsuspension im FACS-Röhrchen, das bis zur Analyse lichtgeschützt auf Eis gelagert wurde.

Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen anschließend fixiert und deren Zellwände permeabilisiert, damit die Antikörper ins Zelleninnere eindringen können. Hierfür wurde das Cytotfix/Cytoperm Kit (BD) verwendet und nach genauen Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.2.2 Magnetische Zellseparation (MACS)

Die magnetische Zellseparation (MACS, Miltenyi Biotech) ermöglicht es, Zellen durch Markierung bestimmter Oberflächenantigene mit Antikörpern, die an paramagnetische Partikel (Microbeads) gekoppelt sind, zu separieren.

Die Separation erfolgt über eine Säule, die in ein starkes Magnetfeld platziert wird. Die Zellsuspension wird in die Säule pipettiert und die magnetisch markierten Zellen bleiben an der Säule haften. Sobald die Säule aus dem Magnetfeld genommen wird, können die markierten Zellen eluiert werden.

Es gibt zwei mögliche Methoden der Isolierung: zum einen können die Zellen markiert werden, die man gewinnen möchte (positive Selektion, Microbeads), zum anderen können alle Zellen markiert werden, die man nicht gewinnen möchte (negative Selektion, Isolation Kit). In diesem Fall müssen die Zellen, die die Säule verlassen, aufgefangen werden.

Für die Experimente in dieser Arbeit wurden beide Methoden verwendet.

Zur Isolierung von DC wurden CD11c-Microbeads verwendet. Zur Isolierung von CD4⁺ T-Zellen wurden mit dem CD4⁺ T Cell Isolation Kit, CD8⁺ T-Zellen mit dem CD8⁺ T Cell Isolation Kit isoliert.

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.2.2.3 Bestimmung von Zellzahlen

Zur Bestimmung der Zellzahlen wurde ein Coulter Counter Z2 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) verwendet. Das Prinzip der Messung basiert auf der Veränderung des elektrischen Widerstandes, der von einer Zelle ausgelöst wird, die in einer elektrisch-leitfähigen Flüssigkeit suspendiert wird und eine Kapillaröffnung zwischen zwei Elektroden passiert. Durch die Anzahl der Impulse lässt sich die Zellzahl bestimmen und die Höhe des elektrischen Impulses verhält sich proportional zur Zellgröße. Die Zugabe von Zap-O-Globin (Beckman Coulter) ermöglicht es, lebende von toten Zellen, sowie von Erythrozyten zu unterscheiden.

Dafür wurden von jeder zu untersuchender Zellsuspension 10 µl in 10 ml Isoton II-Lösung (Beckman, Coulter) gegeben und mit jeweils 2 µl Zap-O-Globin vermischt. Anschließend konnte die Zellzahl im Coulter Counter Z2 bestimmt werden.

3.2.2.4 Gewinnung von Blut und Organen der Mäuse

Entnahme der Organe

Für die Entnahme der Organe wurden die Mäuse mit Isofluran inhalativ narkotisiert und anschließend mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Mäuse wurden dann auf einem

Styroporbrett an den Extremitäten mit Nadeln fixiert und mit 70-prozentigem Alkohol desinfiziert. Daraufhin wurden je nach Experiment die Milz, Lymphknoten (zervikal, axillär und inguinal) und die Hinterbeine vorsichtig mit Pinzette und Schere gelöst und entnommen.

Die Organe wurden unverzüglich in geeigneten Reaktionsgefäßen in PBS und auf Eis gelagert und schnellstmöglich für die jeweiligen Versuche weiterverarbeitet.

Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Nach Organentnahme wurden Milzen und Lymphknoten mit DNase I (0,2mg/l) und Liberase (0,65 Wünsch units/l, beide Roche) bei 37°C für 30 Minuten verdaut. Die Organe wurden dann in ein Zellsieb gegeben (Cell Strainer, 100µm, BD), das auf ein 50 ml Reaktionsgefäß platziert wurde, mit dem Stempel einer Injektionsspritze zerrieben und anschließend mit PBS gespült. Die Zellsuspension wurde dann bei 1340 upm und bei 4°C 8 min. lang zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgegossen oder abgesaugt und die Zellen einer Erythrozytenlyse unterzogen.

Für die Herstellung von Kulturen von DC aus dem Knochenmark (BMDC – *bone marrow derived dendritic cells*) wurden Femur und Tibia der Hinterbeine vorsichtig voneinander getrennt, von Muskulatur und Sehnen befreit und anschließend kurz mit 70-prozentigem Ethanol desinfiziert. Danach wurden die Epiphysen der Knochen mit einer kleinen Schere entfernt, um den Markraum zu eröffnen. Mit einer kleinen Nadel wurden die Knochenmarkszellen dann mit Hilfe einer Spritze mit RPMI herausgespült und in eine Zellkulturplatte überführt. Die Zellen wurden daraufhin in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und dabei mit einem Zellsieb filtriert und bei 1340 rpm und bei 4°C 8 min. lang zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgegossen oder abgesaugt und die Zellen einer Erythrozytenlyse unterzogen. Nach anschließender Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen für 7 Tage in DC-Zellkulturmedium inkubiert (detaillierte Beschreibung siehe Kap. 3.2.2.5).

Gewinnung von peripherem Blut

Vor dem Eingriff wurden die Mäuse für einige Minuten unter einer Infrarotlampe erwärmt, um dadurch ihre peripheren Gefäße zu weiten und damit die Blutabnahme zu erleichtern. Die Mäuse wurden in eine Falle gesetzt und der Schwanz wurde mit einem Skalpell vorsichtig angeritzt. Wenige Tropfen Blut wurden dann mit einem 1,5 ml Reaktionsgefäß

aufgefangen und mit Natrium-Heparin vermischt, um die Gerinnung des Blutes zu verhindern.

Erythrozytenlyse

Erythrozyten aus dem peripheren Blut wurden mit dem „Pharm Lyse reagent“ (BD) lysiert. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Um Erythrozyten aus Milz-, Lymphknoten oder BMDC-Suspensionen zu entfernen, wurden die Zellpellets in 1 ml ACK Puffer resuspendiert und 5 min. bei Raumtemperatur gelagert. Die Reaktion wurde mit 5-10 ml PBS gestoppt. Ein weiterer Zentrifugierschritt (1340 upm bei 4°C für 8 min.) folgte. Danach wurden die Zellen in der Regel in 1 ml PBS, MACS Puffer oder FACS Puffer resuspendiert und deren Zellzahl bestimmt.

3.2.2.5 Zellkultur

Kultivierung von BMDC

Knochenmarkszellen wurden nach der Erythrozytenlyse und der Bestimmung der Zellzahl in DC-Medium kultiviert. Die Zellkonzentration war dabei 1×10^6 Zellen/ml. In jede 10 cm Zellkulturplatte wurden 10 ml DC-Medium gegeben und diese wurden 7 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das DC-Medium enthielt das Cytokin GM-CSF, das *in vitro* die Differenzierung von dendritischen Zellen des Knochenmarks induziert. Dafür wurde eine modifizierte Version des Protokolls von Inaba verwendet (92). Nach 3 Tagen wurde das Medium ausgewechselt und die Zellen in frisches Medium gegeben. Nach 7 Tagen wurden die Zellen aus der Kultur entnommen. Um die Zellen anschließend per MACS einer positiven Selektion zu unterziehen, wurden vorher die CD11c⁺ Zellen mit CD11c-Microbeads markiert.

3.2.2.6 Adoptiver Zelltransfer

Bei dieser Methode werden T-Zellen einer Spendermaus in eine syngene Empfängermaus übertragen. Dies ermöglicht es, das Verhalten einer geringen Anzahl an Zellen *in vivo* zu beobachten. Es wurden jeweils die großen Lymphknoten und die Milz der Mäuse entnommen und nach Verdau und Lyse durch ACK-Puffer einer negativen Selektion (MACS) unterzogen. So wurden je nach Versuch entweder CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen

isoliert. Nach der Isolation durch MACS wurde eine FACS-Analyse zur Reinheitskontrolle durchgeführt. Es wurden pro Empfängermaus 5×10^5 bzw. 2×10^6 Zellen in syngene, gleichgeschlechtliche Empfängermäuse transferiert. Da die Ausbeute an $CD8^+$ T-Zellen regelmäßig niedriger war, entschieden wir uns hier für eine geringere Menge an Zellen (5×10^5). Der Zelltransfer erfolgte durch Injektion in die Schwanzvene der Maus. Die Detektion der transferierten Zellen wurde durch den kongenen Marker Thy1.1 (CD90.1) ermöglicht.

3.2.2.7 *In vitro* T-Zell-Restimulation

Um die Zytokinexpression von $CD4^+$ T-Zellen zu untersuchen, wurden die Mäuse getötet und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Jeweils 2×10^6 Zellen wurden in 96-Lochplatten gegeben und mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin stimuliert mit einer Konzentration von 40 ng/ml bzw. 1 μ g/ml. Der Reaktion wurden noch 2 μ M Golgi-Stop (BD) hinzugefügt, was die Proteinsekretion blockiert, und die Zellen über 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimalig mit FACS-Puffer gewaschen und einer extrazellulären Färbung unterzogen. Um die Zellwände zu permeabilisieren und durchgängig für Antikörper zu machen wurde das Cytotfix/Cytoperm Kit (BD) verwendet und für 20 min. bei 4°C abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Perm/Wash Buffer (BD) gewaschen und mit den jeweiligen Antikörpern für die intrazelluläre Färbung für 30 min. bei 4°C abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und in FACS Puffer resuspendiert bis sie für die FACS-Analyse verwendet wurden.

3.2.2.8 *Depletion der Darmflora*

Die Mäuse wurden ab der 3. Lebenswoche mit Ampicillin-Natriumsalz (1 g/L; Roth), Vancomycin-Hydrochlorid (500 mg/L; Roth), Neomycin-Sulfat (1 g/L; Roth) und Metronidazol (1 g/L; Sigma-Aldrich) in Trinkwasser gelöst für mindestens 3 Wochen behandelt.

3.2.3 Statistische Analyse

Die P-Werte wurden mit dem Student's t test der PRISM Software errechnet (GraphPad software, La Jolla, CA, USA) und folgendermaßen definiert: ***: $P < 0,001$, **: $P = 0,001$ bis $0,01$, *: $P = 0,01$ bis $0,05$, n.s. (nicht signifikant): $P > 0,05$. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von den jeweiligen Mittelwerten an.

4 Ergebnisse

4.1 DC-LMP1/CD40-Mäuse erkranken schwer

Bei der Zucht des DC-LMP1/CD40-Mausstammes zeigte sich eine ausgeprägte Gedeihstörung und stark verringerte Lebenserwartung, die drastisch auf 10-20 Wochen reduziert war. Die Beobachtungen deuteten auf eine schwere Immunerkrankung hin, was uns zuerst dazu veranlasste, die lymphatischen Organe makroskopisch zu untersuchen. Es zeigte sich bei 8-12 Wochen alten Mäusen eine deutliche Vergrößerung der Milz, eine Verkürzung und Verdickung des Colons und damit einhergehend eine deutliche Vergrößerung der mesenterischen Lymphknoten (Abb. 4-1). Die Veränderungen des Colons ließen auf eine schwere intestinale Entzündung schließen.



Abb. 4-1: Links: Verkürzung und Verdickung des Colons. Rechts oben: Vergrößerung der mesenterischen Lymphknoten. Rechts unten: Splenomegalie. Jeweils rechts im Bild sind die Organe der DC-LMP1/CD40 Mäuse ca. im Alter von 9 Wochen dargestellt. Links im Bild die Organe gesunder C57BL/6 Kontrollmäuse.

4.2 Adoptiver Zelltransfer von CD8⁺ P14-Zellen in DC-LMP1/CD40-Mäuse

Im Folgenden wollten wir untersuchen, inwieweit diese Veränderung in DC-LMP1/CD40-Mäusen die Fähigkeit von Dc zur Toleranzinduktion beeinflussten. Hierzu verwendeten wir zunächst einen adoptiven Transfer von P14 T-Zellen.

Der P14 T-Zellrezeptor ist spezifisch für das Peptid GP33, aus dem Glycoprotein von LCMV, welches über MHC I-D^b präsentiert wird (90). P14-Mäuse sind transgen für diesen TCR. GP33 ist dabei eines der am häufigsten verwendeten Modellantigene in der immunologischen Forschung. T-Zellen, die den P14 TCR tragen, sind in der Vergangenheit vielfältig in Mausmodellen im Rahmen von Autoimmunerkrankungen, antiviraler Immunität und Tumorabstoßung untersucht worden (93-96). P14 CD8⁺ T-Zellen, die GP33 über den TCR binden, werden aktiviert und proliferieren entsprechend.

Verschiedene Studien konnten auch zeigen, dass DC für die Aktivierung GP33 spezifischer T-Zellen entscheidend sind. So konnte beispielsweise nach *in vivo* Depletion von DC durch Diphtherietoxin keine MHC I-D^b abhängige spezifische T-Zellantwort durch GP33 detektiert werden (97, 98). P14 CD8⁺ T-Zellen konnten über den kongenen Marker CD90.1 detektiert und so von endogenen T-Zellen differenziert werden.

Um die Fähigkeit von DC zu untersuchen, Toleranz zu induzieren, machten wir nun Gebrauch von einem adoptiven Zelltransfer. Hierfür isolierten wir P14 CD8⁺ T-Zellen per MACS und injizierten jeweils 5×10^5 dieser Zellen in C57BL/6-Kontrollmäuse und DC-LMP1/CD40-Mäuse über die Schwanzvene. Um die transferierten Zellen funktionell zu untersuchen, können sie nach erneuter Isolation aus den Tieren mit dem bekannten Peptid GP33 stimuliert werden und anschließend durchflusszytometrisch analysiert werden.

Am Tag nach dem adoptiven Zelltransfer wurden DC-LMP1/CD40-Mäuse und C57BL/6 mit GP33 immunisiert. Weiter wurde als Positivkontrolle eine Gruppe von C57BL/6 mit GP33 und anti-CD40-Antikörper zugleich immunisiert. Eine Gruppe C57BL/6-Mäuse blieb bis auf den adoptiven Zelltransfer unbehandelt. Wären die DC in DC-LMP1/CD40-Mäusen voll aktiviert, so würden wir eine Stimulierung der P14 T-Zellen ähnlich wie in der Positivkontrolle erwarten.

An Tag 4 nach der Injektion der Zellen wurden die Mäuse getötet und die Milzen entnommen. Die gewonnenen Milzzellen wurden anschließend einer Restimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin über 4 Stunden bei 37°C im Inkubator unterzogen. Im Anschluss erfolgte sowohl eine Färbung von CD8 und CD107a, sowie eine intrazelluläre Färbung für die Zytokine IFN- γ und TNF- α . Die Zellen wurden anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die Überlegungen vor diesem Versuch waren, dass wenn ein konstitutives CD40-Signal auf DC zu einer vollen funktionellen Reifung führte, es zu einer Proliferation von P14

CD8⁺ T-Zellen in DC-LMP1/CD40-Mäusen kommen müsste, für die es keines weiteren Stimulus bedarf, damit die T-Zellen ihre Effektorfunktionen ausführen können. Die Anzahl der nach 4 Tagen nachgewiesenen P14-Zellen wurde als Surrogatmarker für die Proliferation und das Überleben der Zellen *in vivo* genutzt.

Eine deutliche Zunahme von P14 CD8⁺ T-Zellen wurde nur in den Kontrollmäusen, die mit GP33 und anti-CD40 mAb immunisiert wurden, beobachtet. Bei den Kontrollmäusen, die nur mit GP33 immunisiert wurden, fiel dieser Effekt deutlich geringer aus, bei DC-LMP1/CD40-Mäusen war nur eine geringe Zunahme zu erkennen (Abb. 4-2).

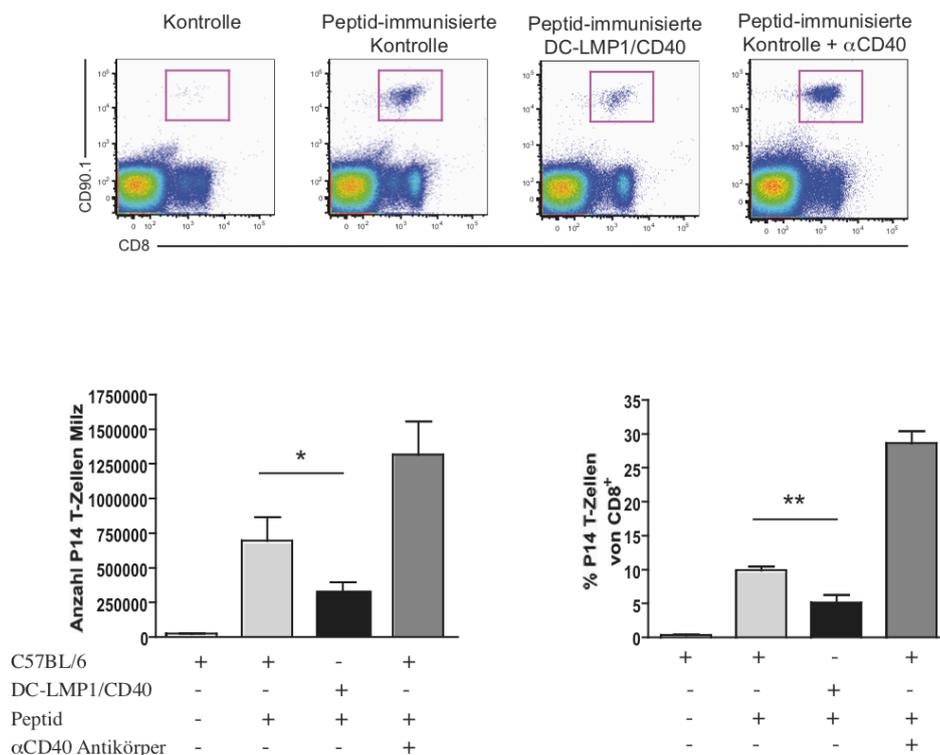


Abb. 4-2 Oben dargestellt sind FACS-Plots, die die Population an P14 CD8⁺ T-Zellen unter allen Milzzellen markieren. Unten werden links die absoluten Zahlen der P14 CD8⁺ T-Zellen in den Milzen der jeweiligen Versuchstiere aufgeführt. Unten rechts der prozentuale Anteil von P14 CD8⁺ T-Zellen unter allen CD8⁺ Zellen. Die Unterschiede zwischen mit GP33-Peptid immunisierten Kontrollmäusen und DC-LMP1/CD40-Mäusen waren jeweils signifikant. Es gilt pro Gruppe jeweils n=3. Die Statistische Analyse und Berechnung der P-Werte erfolgte wie in Kap. 3.2.3 beschrieben.

In der Analyse der Zytokinexpression mittels Durchflusszytometrie nach Restimulation der Zellen zeigte sich lediglich eine leicht erhöhte Expression von CD107a und IFN- γ der P14 CD8⁺ T-Zellen in DC-LMP1/CD40 Zellen im Vergleich zu den mit GP33 immunisierten

Kontrollmäusen. In beiden ausschließlich mit GP33 immunisierten Gruppen konnten keine relevanten Mengen TNF- α produzierender P14 CD8⁺ Zellen nachgewiesen werden. Die Kontrollmäuse, die neben GP33 zusätzlich mit anti-CD40 mAb immunisiert wurden, zeigten hingegen eine deutliche Zunahme der Expression von CD107a und IFN- γ (Abb. 4-3).

CD107a wird als Marker für Degranulation von CD8⁺ T-Zellen nach deren Stimulation verwendet, während IFN- γ und TNF α als proinflammatorische Zytokine von T-Zellen ausgeschüttet werden, um Effektorfunktionen in der Abwehr von Pathogenen einzuleiten.

Zusammenfassend bestehen keine Anzeichen dafür, dass die Toleranzinduktion in DC-LMP1/CD40-Mäusen außer Kraft gesetzt ist. Sonst wäre eine ähnlich starke Effektorfunktion wie in den mit GP33 und anti-CD40 mAb immunisierten Kontrollmäusen zu sehen gewesen. Dennoch lag der Prozentsatz der IFN- γ ⁺ CD107a⁺ Zellen bei DC-LMP1/CD40 Mäusen, die mit GP33 immunisiert wurden deutlich höher (7,4% zu 14,8%) als in den mit GP33 immunisierten Kontrollmäusen, was auf einen intermediären Effekt schließen lässt.

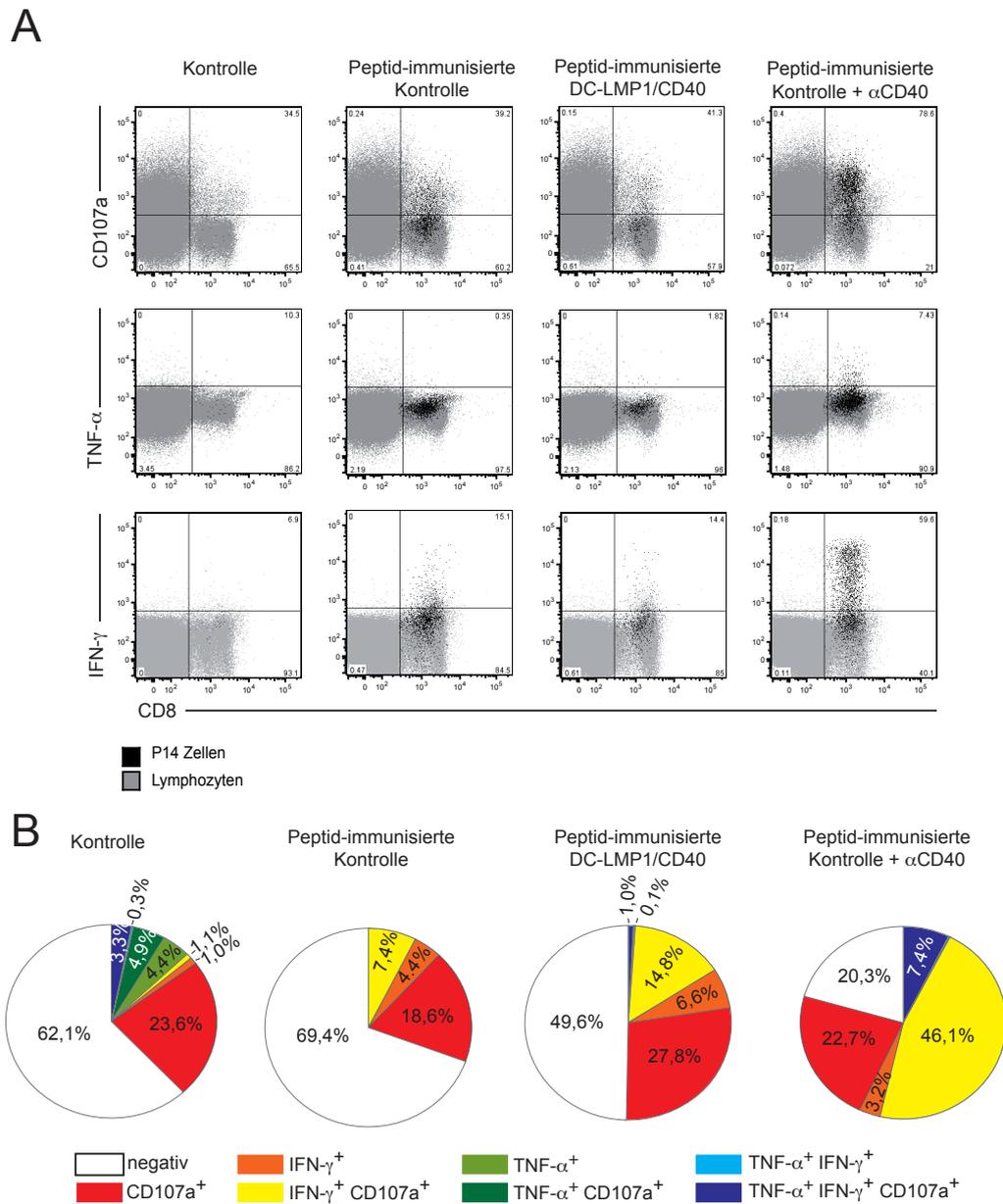


Abb. 4-3 **A** Nach Restimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin der Milzzellen werden mittels FACS-Plots in schwarz markiert P14 CD8⁺ Zellen dargestellt, in grau die Gesamtheit der Lymphozyten. Für die jeweiligen Versuchsgruppen sind einzeln die Expressionen von IFN- γ , TNF- α und CD107 dargestellt. **B** Zusätzliche Veranschaulichung von A mittels Kreisdiagramm. In Prozent ist der Anteil der P14 CD8⁺ Zellen dargestellt, der das jeweilige bunt markierte Zytokin exprimiert, bzw. die doppelt oder dreifach positiven Zellen. Es gilt pro Gruppe jeweils n=3.

4.3 Adoptiver Zelltransfer von CD4⁺ SMARTA-Zellen in DC-LMP1/CD40-Mäusen mit depletierter Darmflora

Analog zum P14-Mausmodell dienten uns SMARTA1-Mäuse dazu, antigenspezifische CD4⁺-T-Zellen mittels adoptivem Zelltransfer in unsere Versuchsmäuse einzubringen.

SMARTA1-Mäuse sind transgen für einen TCR, der das Epitop GP61 von LCMV im Kontext von MHCII I-A^b erkennt (88). Auch in diesem Versuch diente uns der kongene Marker CD90.1 zur Detektion der in die Versuchsmäuse transferierten Zellen.

In vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe (Daten nicht veröffentlicht) zeigte sich, dass transferierte CD4⁺ T-Zellen in DC-LMP1/CD40-Mäusen stark proliferierten. Um festzustellen, ob dies auch bei Mäusen, deren Darmflora vorher mit Antibiotika depletiert wurde und somit ein wesentlicher externer Stimulus wegfällt, der Fall ist, führten wir den Versuch erneut durch. Dafür wurden sowohl DC-LMP1/CD40-, als auch C57BL/6-Mäuse ab der 3. Lebenswoche bis zum Start des Experiments mit vier verschiedenen Antibiotika (Ampicillin, Vancomycin, Neomycin und Metronidazol) in Trinkwasser gelöst behandelt. Durch die Behandlung mit diesen Antibiotika kann eine weitgehende Depletion der Darmflora erreicht werden.

Jeder Maus wurden 2×10^6 SMARTA CD4⁺ T-Zellen in die Schwanzvene injiziert. Am Folgetag wurden C57BL/6 Kontrollmäuse entweder nur mit GP61 oder zusätzlich mit anti-CD40 mAb immunisiert. Die Gruppe der DC-LMP1/CD40-Mäuse wurde ebenfalls mit GP61 immunisiert. Eine Gruppe C57BL/6-Kontrollmäuse wurde über die Injektion der Zellen hinaus nicht behandelt.

Im Verlauf des 14-tägigen Experiments wurde den Mäusen an den Tagen 3, 6, 9 und 13 jeweils ein wenig Blut aus der Schwanzvene entnommen. Die Blutzellen wurden dann anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei wurde vor allem auf die Veränderung der SMARTA-Zellzahl im peripheren Blut geachtet. Zusätzlich war der Anteil der aktivierten SMARTA-Zellen von Interesse (CD62⁻, CD44⁺).

Es zeigte sich im Zeitverlauf zunächst eine deutliche Zunahme der SMARTA CD4⁺ T-Zellen im Blut sowohl in DC-LMP1/CD40-Mäusen, als auch in den mit GP61 und anti-CD40 mAb immunisierten Kontrollmäusen mit einem Höhepunkt an Tag 6. Im weiteren Zeitverlauf verschwanden die Zellen weitgehend aus dem peripheren Blut und konnten am Tag 13 nur noch in kleinen Zahlen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu kam es in den unbehandelten Kontrollmäusen und den lediglich mit GP61 immunisierten Mäusen zu keiner signifikanten Zunahme der SMARTA-Zellzahl im peripheren Blut.

Im zeitlichen Verlauf war die Anzahl der aktivierten CD62⁻/CD44⁺ SMARTA CD4⁺ T-Zellen sowohl in DC-LMP1/CD40 Mäusen, als auch in den mit anti-CD40 mAb immunisierten Kontrollmäusen zunehmend, während die aktivierten Zellen in lediglich mit

GP61 immunisierten Kontrollmäusen nach einem initialen Anstieg bis Tag 9 wieder abnahmen. Dabei zeigte sich die Kinetik des Anstiegs von aktivierten SMARTA CD4⁺ T-Zellen zwischen DC-LMP1/CD40 Mäusen und den mit anti-CD40 mAb immunisierten Kontrollmäusen deutlich verschieden. Der Anstieg zu Beginn war dabei bei den Kontrollmäusen deutlich rascher und flachte ab Tag 9 ab, während der Anteil der aktivierten SMARTA-Zellen in DC-LMP1/CD40-Mäusen bis Tag 13 kontinuierlich zunahm.

Bei den unbehandelten Kontrollmäusen kam es wie erwartet zu keiner Zunahme an aktivierten SMARTA CD4⁺ T-Zellen (Abb. 4-4).

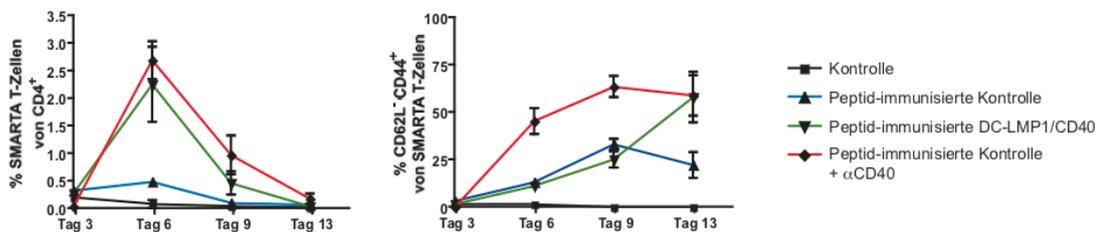


Abb. 4-4 Nach adoptivem Zelltransfer von SMARTA CD4⁺ T-Zellen wurde den Mäusen an den Tagen 3, 6, 9 und 13 Blut entnommen. Links ist in Prozent der Anteil an aktivierten Zellen (CD62L⁻ CD44⁺) unter den transferierten SMARTA CD4⁺ T-Zellen dargestellt. Rechts ist die relative Zellezahl von SMARTA CD4⁺ T-Zellen im Zeitverlauf in Prozent von allen CD4⁺ Zellen dargestellt. Wie in Abb. 4-5 gezeigt wurden die hier als SMARTA T-Zellen bezeichneten Zellen nach CD90.1⁺ und CD4⁺ ausgewählt. Es gilt pro Gruppe jeweils n=3.

An Tag 13 des Experiments wurden die Mäuse getötet und die Organe entnommen. Die Analyse der Anzahl der SMARTA CD4⁺ T-Zellen in den Milzen der einzelnen Versuchsgruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten Kontrollmäusen, mit GP61 behandelten Kontrollmäusen und mit GP61 behandelten DC-LMP1/CD40-Mäusen. Lediglich in den als Positivkontrolle dienenden zusätzlich mit anti-CD40 mAb immunisierten Kontrollmäusen war eine deutliche Zunahme der Anzahl an SMARTA CD4⁺ T-Zellen nachzuweisen.

Zusammenfassend zeigten sich in DC-LMP1/CD40-Mäusen, deren Darmflora zuvor mittels Antibiotika depletiert wurde, keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollmäusen im Bezug auf die Anzahl der in der Milz gefundenen SMARTA-Zellen. Der Anteil der aktivierten Zellen unter den detektierten SMARTA-Zellen nahm in mit GP66 immunisierten DC-LMP1/CD40-Mäusen kontinuierlich zu, während es in den

ebenfalls mit GP66 immunisierten Kontrollmäusen ab Tag 9 zu einer Abnahme deren Anteil kam. Diese Abnahme an aktivierten Zellen im Zeitverlauf kann man klassischerweise im Rahmen von Toleranzinduktion beobachten.

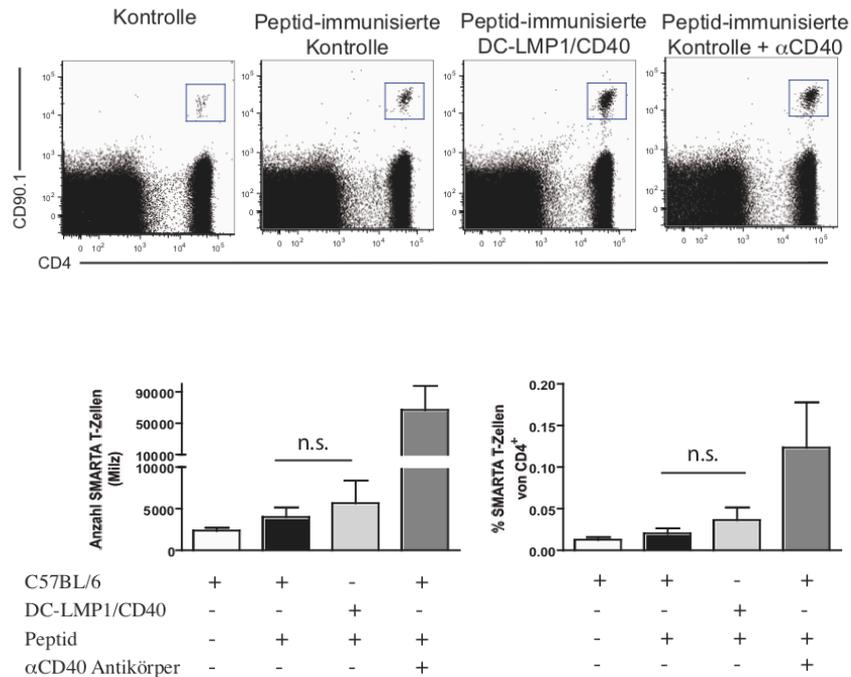


Abb. 4-5 Oben dargestellt sind FACS-Plots, die die Population an SMARTA CD4⁺ T-Zellen unter allen Milzzellen markieren. Unten werden links die absoluten Zahlen der SMARTA CD4⁺ T-Zellen in den Milzen der jeweiligen Versuchstiere aufgeführt. Unten rechts der prozentuale Anteil von SMARTA CD4⁺ T-Zellen unter allen CD4⁺ Zellen. Die Unterschiede zwischen mit GP61-Peptid immunisierten Kontrollmäusen und DC-LMP1/CD40-Mäusen waren jeweils nicht signifikant (n.s.). Es gilt pro Gruppe jeweils n=3

4.4 Th1- und Th17-Zellen als Effektorzellen bei der Entstehung der Colitis in DC-LMP1/CD40-Mäusen

Entzündliche Prozesse und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen sind häufig mit erhöhter Sekretion von IFN- γ und IL-17 durch T-Zellen assoziiert. Aus diesem Grund untersuchten wir das Potenzial von CD4⁺ T-Zellen zur Produktion dieser Zytokine in DC-LMP1/CD40-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen. Dabei ist für Th1-Lymphozyten die Sekretion von IFN- γ neben weiteren Zytokinen wie IL-2 und TNF α charakteristisch, während die Sekretion von IL-17 charakteristisch für Th17-Lymphozyten ist. Darüber hinaus gibt es auch T-Zellen, die sowohl IFN- γ , als auch IL-17 sezernieren.

Für den Versuch wurden DC-LMP1/CD40-Mäuse und Kontrollmäuse in verschiedenen Altersgruppen (5, 7, 9 und 15 Wochen) ausgewählt. Um Sekundäreffekte durch die Inflammation des Darmes auszublenden, untersuchten wir zusätzlich eine Gruppe DC-LMP1/CD40-Mäuse im Alter von 6 Wochen, deren Darmflora zuvor nach oben beschriebenen Protokoll mittels Antibiotika depletiert wurde.

Die Mäuse wurden zu den genannten Zeitpunkten getötet und ihre Milzen und Lymphknoten (mesenterische Lymphknoten, sowie Hautlymphknoten) entnommen. Die anschließend *in vitro* mit PMA und Ionomycin restimulierten Zellen wurden einer intrazellulären Färbung (IFN- γ und IL-17A) für die Durchflusszytometrie unterzogen.

Dabei zeigte sich in DC-LMP1/CD40-Mäusen sowohl in der Milz, als auch in den mesenterischen Lymphknoten (mLN) eine Zunahme an IL-17A⁺ Th17-Zellen, IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ Th17/Th1-Zellen und IFN- γ ⁺ Th1-Zellen in nahezu allen Altersgruppen. Die Ergebnisse waren zwar nicht durchweg signifikant, die Tendenz lässt sich allerdings aus Abbildung 4-6 eindeutig ablesen. Für die Erhöhung von IL17A⁺ Zellen in mLN zeigte sich dabei die geringste Signifikanz, so dass hier eher von keiner wesentlichen Zunahme von Th17⁺ T-Zellen auszugehen ist.

In den mit Antibiotika behandelten DC-LMP1/CD40-Mäusen zeigte sich keine Zunahme an Th1- bzw. Th17-Zellen. Auch in den Hautlymphknoten (sLN), waren diese Effekte nicht nachweisbar.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse eine signifikante Erhöhung von IL-17A⁺ Th17-Zellen, IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ Th17/Th1-Zellen und IFN- γ ⁺ Th1-Zellen in der Milz, während im mLN es zu einer Zunahme an IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ Th17/Th1 Zellen und IFN- γ ⁺ Th1-Zellen, nicht aber von IL-17A⁺ Th17-Zellen kommt. In den sLN gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen. In den Mäusen, deren Darmflora mit Antibiotika depletiert wurde kam es ebenfalls zu keinen signifikanten Unterschieden in der Expression von IL17A und IFN- γ .

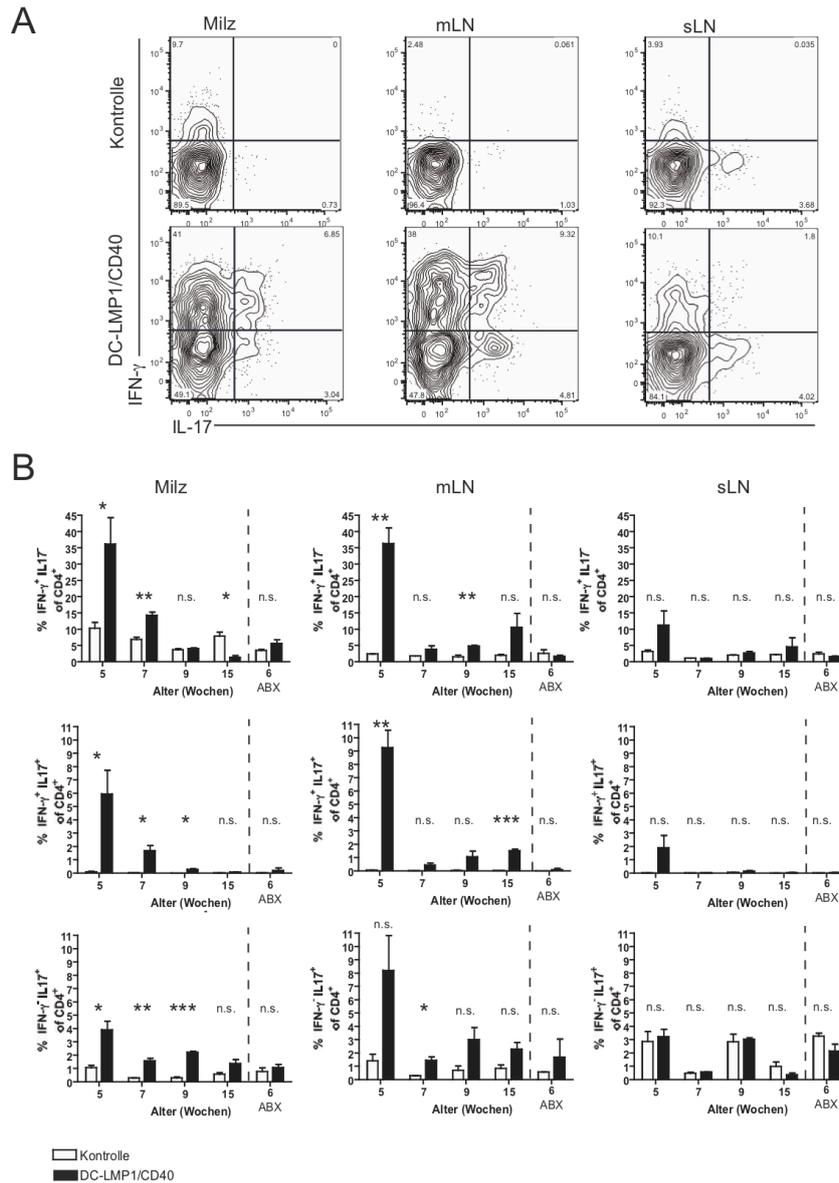


Abb. 4-6. In DC-LMP1/CD40 Mäusen zeigt sich eine signifikante Zunahme an proinflammatorischen T-Zellen in Milz und mesenterischen Lymphknoten. **A** Representative FACS Plots IL-17A oder IFN- γ produzierender CD4⁺ T-Zellen in Milz, mesenterischen Lymphknoten und Hautlymphknoten. **B** Anteil von CD4⁺ T-Zellen, die entweder IL-17A, IFN- γ oder beides exprimieren. Dargestellt ebenfalls in Milz, mesenterischen Lymphknoten (mLN) und Hautlymphknoten (sLN) in verschiedenen Altersgruppen, sowie einer mit Antibiotika (ABX) behandelten Gruppe von DC-LMP1/CD40 Mäusen. Es gilt pro Gruppe jeweils n=3

4.5 Genexpressionsanalyse in BMDC

Um Änderungen der Genexpression in DC-LMP1/CD40-Mäusen zu erfassen, untersuchten wir BMDC anhand einer Genexpressionsanalyse (Microarray-Analyse).

4.5.1 Genexpressionsanalyse

Für die Analyse der BMDC wurden zuvor BMDC-Kulturen über 7 Tage angelegt (siehe Kap. 3.2.2.6) und die Zellen anschließend zuerst per MACS einer positiven Selektion auf CD11c⁺ Zellen unterzogen. Die daraufhin anhand der Durchflusszytometrie bestimmte Reinheit der CD11c⁺ Zellen, ergab stets >85% in DC-LMP1/CD40-Mäusen und stets >90% in den Kontrollmäusen (siehe Abb. 4-7A). Aufgrund der zufriedenstellenden Reinheit nach MACS verzichteten wir in diesem Versuch auf eine durchflusszytometrische Zellsortierung, um eine noch bessere Reinheit zu erreichen.

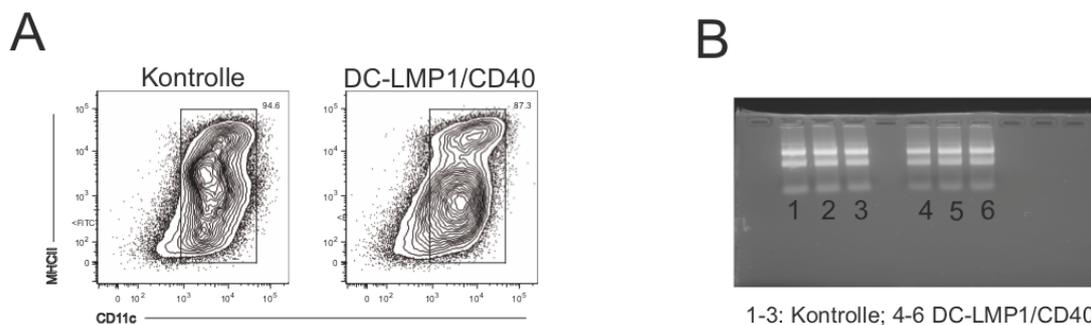


Abb. 4-7 **A** Reinheit der MACS-sortierten CD11c⁺ BMDC, dargestellt in einem FACS-Plot. Representativ für jeweils n=3 **B** Kontrolle auf vorliegende RNA in den entsprechenden Proben nach RNA-Isolierung. Dargestellt sind jeweils die Banden der 16s- und 23s-rRNA

Nach anschließender Isolierung der RNA nach zuvor beschriebenem Protokoll wurde die Microarray-Analyse durch die Arbeitsgruppe Prof. Thorsten Buch (Group of Expression Core Facility, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München) durchgeführt.

Das Knochenmark eignet sich besonders zur Kultivierung von DC, da es leicht verfügbar ist und zahlreiche DC-Vorläuferzellen enthält. Durch den Zusatz von GM-CSF zum Kulturmedium wird die Differenzierung der Vorläuferzellen zu DC erreicht.

Die Auswertung der Rohdaten wurde von Dr. Tobias Straub (Biomedical Center Molecular Biology, LMU, Planegg-Martinsried) durchgeführt und uns bereitgestellt.

Die ausgeprägtesten Veränderungen der Genexpression in BMDC der DC-LMP1/CD40-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen sind in Abbildung 4-8 anhand einer Heatmap dargestellt.

Dabei zeigten die Gene *Plcb4*, *Inhba*, *Chi3l3*, *Slc1a2* und *H2-M2* die deutlichste Erhöhung der Expression (5-10 fach) in DC-LMP1/CD40 Mäusen gegenüber Kontrollmäusen, während *CD209a*, *CD209c*, *Fcrls*, *Gfra2* und *C1qc* am deutlichsten herunterreguliert wurden (7-50 fach). Von Interesse ist darüber hinaus auch die erhöhte Expression von *CD205* und *Traf1*.

In der anschließenden Literaturrecherche wurde nach immunologischen Funktionen der aufgezeigten Gene gesucht. Die Ergebnisse der Literaturrecherche sollen später genauer beschrieben und diskutiert werden.

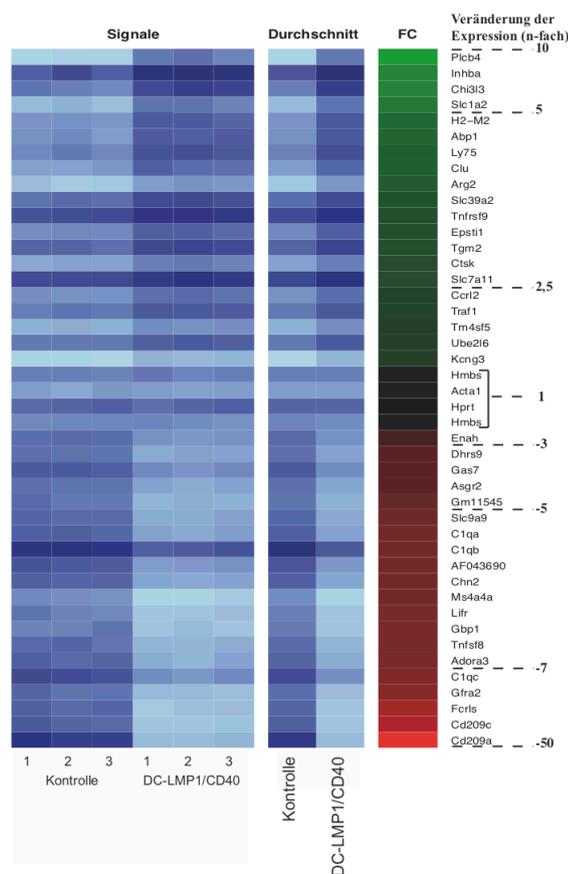


Abb. 4-8 Dargestellt sind mittels einer Heatmap die jeweils 20 ausgeprägtesten Veränderungen der Genexpression von BMDC in DC-LMP1/CD40-Mäusen im Vergleich zu gesunden Kontrollmäusen. FC (Foldchange) steht dabei für die n-fache Veränderung der Genexpression, die der rechten Spalte zu entnehmen ist. Es gilt pro Gruppe jeweils n=3.

4.5.2 Bestätigung der Ergebnisse mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion

Um zu testen, ob sich die obigen Ergebnisse per quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) zuverlässig reproduzieren lassen, wurden erneut BMDC-Kulturen angelegt, die RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Wir führten anschließend jeweils für die fünf am stärksten hoch- bzw. herunterregulierten Gene quantitative PCRs durch, um jeweils eine DC-LMP1/CD40 Maus mit einer Kontrollmaus zu vergleichen. Hierbei zeigte sich im Vergleich zur Microarray-Analyse eine ähnliche Tendenz unter den untersuchten Genen. (siehe Abb. 4-9).

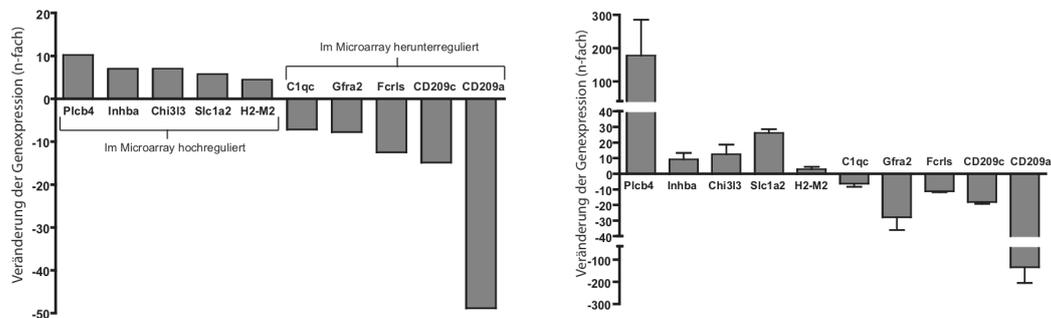


Abb. 4-9 Links ist dargestellt die n-fache Veränderung der Genexpression im Microarray für die jeweils 5 am stärksten deregulierten Gene in BMDC von DC-LMP1/CD40 Mäusen. Rechts ist dargestellt die n-fache Veränderung im Bestätigungsversuch mittels qPCR. Es gilt pro Gruppe jeweils n=3.

5 Diskussion

Der Einfluss von CD40-Signalen auf DC ist noch nicht im Detail verstanden. Auch herrscht noch Unklarheit darüber inwieweit CD40-Signale zur funktionellen und phänotypischen Reifung von DC führen.

Das von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Mausmodell ermöglichte es uns, die Effekte durch ein intrinsisches, konstitutives CD40-Signal auf DC ohne externe Stimuli zu untersuchen und zu erforschen welchen Einfluss dies auf die Entwicklung von Toleranz und Immunität hat.

Die bereits veröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe (38) zeigten, dass DC-LMP1/CD40-Mäuse eine ausgeprägte Colitis und Gedeihstörung entwickelten. Die Überlebenszeit war drastisch auf 10-20 Wochen reduziert. Außer im Darm zeigten sich in anderen Organen keine Pathologien.

Es konnte auch gezeigt werden, dass durch das konstitutive CD40-Signal $CD103^+$ DC vermehrt von der Lamina propria in die mesenterischen Lymphknoten migrieren und die Zahl an $ROR\gamma T^+$ iTreg deutlich reduziert war. Da $ROR\gamma T^+$ iTreg Immuntoleranz vermitteln, kommt es zu einem Zusammenbruch der intestinalen Immuntoleranz und zu einer Zunahme an IL17A und IFN- γ produzierenden $CD4^+$ T-Zellen und in der Folge zur fatalen Colitis. Mäuse, deren Darmflora mit Antibiotika depletiert wurde, erkrankten hingegen nicht, was darauf hinweist, dass es eines mikrobiellen Stimulus bedarf, damit diese Effekte auftreten. In einem weiteren Versuch wurden DC-LMP1/CD40-Mäuse mit $Rag1^{-/-}$ Mäusen gekreuzt, die weder T-, noch B-Zellen haben. DC-LMP1/CD40 x $Rag1^{-/-}$ Mäuse erkrankten ebenfalls nicht, so dass die Krankheitsentstehung bei DC-LMP1/CD40-Mäusen sowohl von der Darmflora, als auch von T- und B-Zellen abhängig ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde aufbauend auf den bisherigen Erkenntnissen die Proliferation und Entwicklung von Effektorfunktionen von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in DC-LMP1/CD40-Mäusen in verschiedenen Organen untersucht, was Rückschlüsse auf den Reifungsgrad von DC zulässt. Um Veränderungen in der Genexpression zu detektieren, wurde eine Microarray-Analyse von BMDC durchgeführt. Die Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert werden.

5.1 Erhaltenes Potenzial der Toleranzinduktion durch reduzierte Proliferation von CD8⁺ T-Zellen in DC-LMP1/CD40-Mäusen

Mittels adoptivem Zelltransfer von P14 CD8⁺ T-Zellen wollten wir die Fähigkeit von DC in DC-LMP1/CD40-Mäusen untersuchen, T-Zell-Antworten oder Toleranz zu induzieren. Hier zeigte sich eine geringere Zunahme der Anzahl an transferierten CD8⁺ T-Zellen in DC-LMP1/CD40 Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen. In der Positivkontrolle, die neben GP33 mit anti-CD40 mAb behandelt wurde, zeigte sich die zu erwartende deutliche Expansion der injizierten CD8⁺ T-Zellen, so wie eine deutliche Zunahme der Effektorfunktionen dieser Zellen. Auch wenn die Proliferation von P14 CD8⁺ T-Zellen mittels CFSE- oder Ki67-Färbungen nicht formal untersucht wurde, wird im Folgenden die Anzahl der wiedergefunden transferierten Zellen als Surrogat-Marker für die Proliferation und das Überleben der Zellen *in vivo* genutzt.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass DC in DC-LMP1/CD40-Mäusen in einem sterilen Milieu wie in der Milz durch den transgenen CD40-Stimulus nicht ausreichend gereift werden um CD8⁺ T-Zellen für eine adäquate Immunantwort ausreichend zu aktivieren. So kommt es auch zu einer geringeren Proliferation dieser Zellen. Dies kann auch so interpretiert werden, dass DC hier weiterhin die Fähigkeit besitzen, Toleranz zu induzieren. In unserem Versuch zeigte sich jedoch eine geringfügig höhere Expression von CD107a und IFN- γ in den transferierten CD8⁺ T-Zellen von DC-LMP1/CD40-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen.

Zusammenfassend lässt sich jedoch vermuten, dass die geringere Proliferation von CD8⁺ T-Zellen in der Milz von DC-LMP1/CD40 Mäusen dadurch verursacht wird, dass das konstitutive CD40-Signal in DC durch LMP1/CD40 zu einer unzureichenden Reifung der DC führt. Stattdessen liegen unvollständig gereifte DC vor, die nicht in der Lage sind, ausreichende Immunantworten in Abwesenheit weiterer Stimuli zu induzieren. Auch wenn die Zytokinexpression in DC-LMP1/CD40-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen leicht erhöht war, kann die verringerte Proliferation als Zeichen des Potenzials erhaltener Toleranzinduktion interpretiert werden.

5.2 Keine Krankheitsentstehung und keine verstärkte Proliferation CD4-positiver Zellen bei depletierter Darmflora von DC-LMP1/CD40-Mäusen

Wie bereits zuvor beschrieben erkrankten DC-LMP1/CD40-Mäuse, deren Darmflora mit einer Kombination aus Ampicillin, Vancomycin, Neomycin und Metronidazol, depletiert wurde, nicht. Die lymphatischen Organe waren makroskopisch unverändert, das Überleben im Vergleich zu Kontrollmäusen ebenfalls (38).

In vorangegangenen Versuchen mittels OTII-Transfers unserer Arbeitsgruppe (Daten nicht veröffentlicht) war in DC-LMP1/CD40-Mäusen eine verstärkte Proliferation von CD4⁺ T-Zellen in mLN gezeigt worden. Diese Proliferation und die Aktivierung von naiven T-Zellen führt in diesem Mausmodell im Verlauf zur Entwicklung der Colitis (siehe auch Kapitel 5.3)

Um zu untersuchen, ob diese Beobachtungen abhängig vom bakteriellen Stimulus durch die Darmflora sind, führten wir den Versuch erneut durch, in dem wir wie in Kap. 4.3 beschrieben mittels adoptivem Zelltransfer SMARTA CD4⁺ T-Zellen in verschiedene Versuchsmäuse injizierten. Hier zeigte sich wie erwartet kein signifikanter Unterschied der Anzahl an CD4⁺ Zellen nach Stimulation durch GP61 zwischen Kontrollmäusen und DC-LMP1/CD40-Mäusen.

Diese Beobachtungen unterstreichen unsere vorherigen Ergebnisse, dass es in DC-LMP1/CD40-Mäusen durch die unvollständige Reifung der DC eines zusätzlichen Stimulus bedarf, um Immunantworten auszulösen. Fällt ein wesentlicher externer Stimulus über das Darmmikrobiom nach Depletion der Darmflora weg, kommt es entsprechend auch zu einer geringeren Proliferation von CD4⁺ T-Zellen.

Auch die im peripheren Blut erfasste Zunahme der aktivierten T-Zellen unter SMARTA CD4⁺ T-Zellen in DC-LMP1/CD40 Mäusen im Zeitverlauf führt offenbar ohne zusätzlichen bakteriellen Stimulus aus dem Darm nicht dazu, dass T-Zellen ihre Effektorfunktionen ausführen und es zur Entwicklung von Krankheitszeichen in den betroffenen Mäusen kommt.

5.3 Colitis-Entstehung in DC-LMP1/CD40-Mäusen

In den vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe zeigte sich eine Reduktion von CD103⁺ DC und in der Folge auch ROR γ T⁺ iTreg in der Lamina propria und im mLN. Hierdurch ist die Immuntoleranz herabgesetzt (38).

In unseren Versuchen zeigte sich nach *in vitro* Restimulation der Zellen eine signifikante Erhöhung an IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ Th17/Th1 Zellen und IFN- γ ⁺ Th1-Zellen im mesenterischen Lymphknoten. Die Zahl an IL-17A⁺ Th17-Zellen war hier zwar ebenfalls erhöht, jedoch war diese Erhöhung in den meisten Versuchsgruppen nicht signifikant. Die Rolle von Th17-Zellen wird in der Literatur in den meisten Untersuchungen eher als immunprotektiv im Gewebe beschrieben. Sie tragen auch zur Aufrechterhaltung der Oberflächenbarriere des Darmes bei (99). In einem T-Zell-Transfermodell, in dem die Mäuse eine Colitis entwickeln, wurde gezeigt, dass die Injektion von IL-17^{-/-} T-Zellen den Verlauf der Krankheit aggravierte (100). Andererseits wurde in einem Mausmodell mit durch Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) induzierter Colitis eine proinflammatorische Rolle IL-17⁺ T-Zellen beschrieben (101). Diese widersprüchlichen Ergebnisse erschweren die Interpretation der Rolle von IL-17 in unserem Mausmodell. Es ist aber davon auszugehen, dass IL-17 produzierende T-Zellen keine wesentliche Rolle bei der Entstehung der Colitis in DC-LMP1/CD40-Mäusen spielen, da keine signifikante Zunahme der Expression im mesenterischen Lymphknoten detektierbar war. Im Gegensatz zum mesenterischen Lymphknoten war die Zunahme an IL-17 produzierenden CD4⁺ Zellen in der Milz in fast allen Altersgruppen signifikant.

Anders als bei Th17-Zellen ist die Rolle von Th1-Zellen bei entzündlichen Darmerkrankungen deutlich besser verstanden. Es konnte gezeigt werden, dass Th1-Zellen maßgeblich an der Entstehung von intestinalen Entzündungen beteiligt sind (102). Auch die Beteiligung der doppelt positiven IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ Th17/Th1-Zellen ist in der Literatur bei entzündlichen Prozessen des Darmes sowohl in der Maus, als auch beim Menschen beschrieben (103, 104).

Die wahrscheinlichste Erklärung für die Zunahme an Th1- und Th17/Th1-Zellen und die Entstehung der Colitis in unserem Mausmodell ist die in den vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe nachgewiesene starke Reduktion von ROR γ T⁺ iTregs. Durch den

Wegfall deren immuntoleranten Effekte kommt es zu einer gestörten Immunregulation und damit zur Entstehung der Colitis.

Es soll noch erwähnt werden, dass es in den Hautlymphknoten zu keinen signifikanten Unterschieden im Bezug auf die Expression von IL-17A und IFN- γ kam. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Hautlymphknoten nicht von den entzündlichen Prozessen betroffen sind, die in DC-LMP1/CD40-Mäusen vor sich gehen. Hier fehlt der Stimulus durch die Darmflora, damit DC T-Zellen aktivieren können.

5.4 Änderung der Genexpression in BMDC von DC-LMP1/CD40-Mäusen

Um Änderungen in der Genexpression in DC-LMP1/CD40-Mäusen zu erfassen, isolierten wir BMDC und ließen die Unterschiede im Vergleich zu Kontrollmäusen mittels Genexpressionsanalyse untersuchen. Im Folgenden werden die ausgeprägtesten Veränderungen der Genexpression vorgestellt und deren Bedeutung für die Krankheitsentstehung im vorliegenden Mausmodell diskutiert.

Unter den Genen mit erhöhter Expression in BMDC von DC-LMP1/CD40-Mäusen sind **Plcb4** und **Inhba** zu erwähnen, welche in der Literatur im Rahmen von Tumorerkrankungen ebenfalls mit erhöhter Expression beschrieben sind (105-109). Hier zeigte sich unter allen untersuchten Genen, die deutlichste Expressionserhöhung gegenüber Kontrollmäusen. Über deren Funktion insbesondere auf DC ist in der Literatur nichts beschrieben, so dass hier eine Interpretation nicht möglich ist.

Erhöhungen der **Chi3l3** Expression (auch Ym1) können eine Akkumulation von Neutrophilen durch die Expansion von γ - δ -T-Zellen, welche IL-17 sezernieren, bewirken. Dadurch wird eine immunmodulatorische Wirkung erreicht (110). Da wie bereits erwähnt IL-17 eine eher immunprotektive Rolle zugeschrieben wird, könnte die erhöhte Expression von Chi3l3 in DC-LMP1/CD40 Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen einen Kompensationsmechanismus darstellen, um IL-17 produzierende T-Zellen zu rekrutieren.

Die Hochregulation von **CD205** (auch DEC205) ist im Kontext unseres Mausmodells von besonderem Interesse. Als endozytischer Rezeptor auf DC erkennt CD205 vornehmlich Liganden, die von apoptotischen und nekrotischen Zellen exprimiert werden (111). Ohne

zusätzlichen inflammatorischen Stimulus wird nach Endozytose über CD205 und anschließende Prozessierung, sowie Präsentation über MHCI- bzw. MHCII- Moleküle Toleranz gegen das entsprechende (Selbst-) Antigen induziert, indem T-Zellen in Anergie getrieben werden und es zur Proliferation von Treg kommt. Andererseits kommt es in Kombination mit einem Reifungsstimulus mittels *in vivo* Applikation von anti-CD40 mAb durch über CD205 aufgenommene Antigene zu einer langlebigen Immunität durch antigenspezifische T-Zellen (72, 73, 112, 113). Die erhöhte Expression von CD205 in DC-LMP1/CD40-Mäusen könnte an der Aktivierung und Proliferation von reaktiven T-Zellen und damit an der Entstehung der Colitis beteiligt sein.

Die Erhöhung der Expression von **Trafl** (tumor necrosis factor receptor associated factor 1) ist in unserem Versuch ebenfalls interessant (siehe auch Kap. 2.3.5). Trafl erhöht als Signalmolekül, welches von einer Gruppe von Tumornekrosefaktorrezeptoren (TNFR) wie CD40 und LMP1 abhängig ist, das Zellüberleben. Dies geschieht über die Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalweges und MAPK-Aktivierung (114). Trafl \neg DC zeigen vermehrt Apoptose und eine deutlich geringere Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalweges nach CD40-Stimulation (115). Das Epstein-Barr-Virus exprimiert unter anderem LMP1, um TRAF-Proteine wie Trafl zu rekrutieren und damit CD40 Signale in infizierten B-Zellen nachzuahmen über die Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalweges, JNK und p38/MAPK (82, 83). Damit kann EBV lebenslang in den infizierten Zellen überleben und maligne lymphoproliferative Erkrankungen auslösen. Bei EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen kann eine Überexpression von Trafl festgestellt werden (116, 117). Trafl wird daher als möglicher Angriffspunkt zur Therapie bei EBV-assoziierten Malignomen diskutiert. Trafl-Erhöhungen zeigen sich auch bei verschiedenen chronischen Viruserkrankungen und Autoimmunerkrankungen (118). Die Überexpression von Trafl in BMDC von DC-LMP1/CD40-Mäusen in unserem Versuch kann somit eventuelle direkt auf das konstitutive CD40-Signal zurückgeführt werden. Möglicherweise besteht hier auch eine Art Feedback-Mechanismus, so dass durch die hohe Expression von LMP1/CD40 weniger Signalmoleküle für endogenes CD40 bereitstehen und es somit zu einer erhöhten Expression von Trafl kommt.

Der C-Typ Lektin-Rezeptor dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin (**DC-SIGN, DC209a**) ist beim Menschen als wichtiger Rezeptor des angeborenen Immunsystems beschrieben (119). Im Menschen kann DC-SIGN (hDC-SIGN) auf unreifen DC und Makrophagen in peripheren Geweben wie der Lunge und der

Plazenta gefunden werden (120), sowie auf reifen DC im lymphatischen Gewebe (121). Es ist beteiligt an immunologischen Prozessen wie dem Erkennen von Pathogenen, der Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen, sowie der Aktivierung von T-Zellen (122). Unter acht verschiedenen Homologen in der Maus wird CD209a (auch SIGNR5) als Maus DC-SIGN (mDC-SIGN) bezeichnet, da das Expressionsprofil, sowie die Lokalisation im Genom dem humanen Pendant ähnlich ist (123). Auch für mDC-SIGN konnte gezeigt werden, dass es sich um einen internalisierenden Rezeptor handelt, der in der Lage ist, Antigen zu internalisieren, zu prozessieren und T-Zellen zu präsentieren und diese damit zu aktivieren (124). mDC-SIGN wird vor allem von Monozyten-abstammenden DC exprimiert und kann daher als Marker zur Unterscheidung zu cDC dienen (125). Schettters et al. konnten mittels Antigen-Targetierung von mDC-SIGN zum einen eine antigenspezifische Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zeigen, zum anderen auch signifikant höhere antigenspezifische humorale Immunantworten (124). In hDC-SIGN konnte mittels Targetierung über OVA gezeigt werden, dass antigenspezifische CD8⁺ T-Zellantworten hervorgerufen werden, die zur Zerstörung von OVA-exprimierenden Melanomen führt (126). Insbesondere der positive Effekt auf die humorale Immunabwehr lassen DC-SIGN als attraktives Ziel erscheinen, um Impfungen effektiver zu machen. In unserem Versuch zeigte sich CD209a als das Gen, das von allen signifikanten Genexpressionsveränderungen in DC-LMP1/CD40-Mäusen am stärksten herunterreguliert wurde. Wenn man davon ausgeht, dass eine geringere Expression von CD209a auf DC zu einer geringeren Aktivierung von T-Zellen und geringeren humoralen Immunantworten führt, könnte dies als Kompensationsversuch der Zelle gesehen werden, die überschießende Aktivierung von T-Zellen nach Wegfall immuntoleranter iTregs, abzumildern. Möglicherweise gibt es hier einen Zusammenhang zwischen der konstitutiven CD40-Expression auf DC in DC-LMP1/CD40-Mäusen und der verminderten Expression von CD209a.

CD209c, auch als SIGNR2 bezeichnet, gilt ebenfalls als ein Homolog des humanen DC-SIGN in der Maus. In der Literatur ist jedoch wenig über die Funktion bekannt, so dass auch die deutlich verminderte Expression in DC-LMP1/CD40-Mäusen nicht zu interpretieren ist.

Fc-receptor-like Moleküle (**FCRL**) kamen zu ihrem Namen, da sie Ähnlichkeiten zu Fc-Rezeptoren in ihren Gensequenzen haben und mit diesen in der Lokalisation im Genom benachbart sind (127). FCRL werden fast ausschließlich von B-Zellen exprimiert. Ihre

genaue Funktion ist bisher nicht verstanden. Beim Menschen kodiert diese Genfamilie für sechs Transmembranproteine (FCRL1-6) und zwei intrazelluläre Proteine (FCRLA und FCRLB) (128, 129). In der Maus konnten nur zwei orthologe Gene gefunden werden, die menschlichen FCRL mit B-Zell-Spezifität zugeordnet werden können. Ihnen werden immunmodulatorische Effekte zugesprochen. Dysregulationen der Genexpression wurden bei chronisch infektiösen Erkrankungen wie HIV oder Malaria beschrieben (130). FCRLs steht unter den verschiedenen Untergruppen für Fc-receptor like scavenger receptor. Bisher ist kein Homolog im menschlichen Genom beschrieben und auch keine Funktion in der Maus (131), so dass die verminderte Genexpression in DC-LMP1/CD40-Mäusen aktuell nicht erklärbar ist.

GDNF family receptor alpha-2 (**Gfra2**) wird durch das Gfra2 Gen kodiert (132). Expression von Gfra2 kann als Marker in der Entwicklung von B-Zellen dienen (133). Erhöhte Expressionen führen zur Proliferation von Neuroblastomzellen über den PI3K/AKT Signalweg (134). Darüber hinaus scheint die funktionelle Rolle, insbesondere in der Immunologie unklar.

Das Protein **C1q** stellt als Mustererkennungsmolekül (*engl. Pattern recognition molecule*) einen wichtigen Teil des Komplementsystems dar. Es besteht aus drei Ketten: C1qA, C1qB und C1qC, die von den gleichsam benannten Genen kodiert werden. Es bildet gemeinsam mit C1s und C1r einen Komplex der als Faktor C1 des Komplementsystems bezeichnet wird. Seine Funktion liegt in der Aktivierung des klassischen Weges des Komplementsystems, indem es mehrere Bindungsstellen für Antigen gebundene Antikörper (IgM und IgG) besitzt. Vereinfacht gesagt kommt es in der Folge zu einer Kaskade von Aktivierungsschritten verschiedener Komplementfaktoren, zur Bildung des Membranangriffskomplexes und zur Lyse der Zellmembran des Pathogens, an den C1 ursprünglich über einen Antikörper gebunden hat. Daneben hat C1q noch weitere Funktionen. So spielt es eine Rolle bei der Aktivierung von DC über C1q-Rezeptoren, die auf unreifen DC in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden können, während die Konzentrationen auf reifen DC erniedrigt sind (135). Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von C1q an unreife DC in der Abwesenheit von TNF- α , CD40L und LPS über eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges zur DC-Reifung führt (136). Cq1 kommt somit eine immunmodulatorische Rolle zu. An diesem Protein lässt sich auch veranschaulichen, warum das Komplementsystem oft als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem bezeichnet wird. Darüber hinaus sind DC neben zahlreichen anderen Zellen

wichtige Produzenten von C1q (137, 138). In Folge von Reifungsprozessen verlieren DC die Fähigkeit, C1q zu produzieren. Der angeborene C1q-Mangel ist in hohem Maße mit der Entwicklung von systemischem Lupus erythematoses assoziiert, was vor allem auf die unzureichende Beseitigung apoptotischer Zellen zurückzuführen ist (139). Die erniedrigten Expressionen aller drei Gene, die für C1q kodieren, in BMDC von DC-LMP1/CD40 Mäusen können durch das konstitutive Reifesignal durch CD40 erklärt werden. In der Folge sinkt die Produktion von C1q. Dies könnte über die oben beschriebenen Mechanismen dazu führen, dass weniger C1q-Rezeptoren auf DC mit C1q in Kontakt treten und somit auch ein weiterer Aktivierungsprozess und damit die immunmodulatorische Wirkung von C1q wegfällt. Dies mag zum Zusammenbruch der Toleranz in DC-LMP1/CD40-Mäusen und zur Entwicklung der fatalen Colitis beitragen.

5.4.1 Zusammenfassende Beurteilung der Genexpressionsanalyse

Die untersuchten Ergebnisse mittels Microarray wurden mittels qPCR für die jeweils fünf meist deregulierten Gene bestätigt. Da über die Funktion von Slc1a2 und H2-M2 aktuell in der Literatur nicht viel bekannt ist, werden diese hier nicht weiter diskutiert.

Unter den oben beschriebenen Genen und den von ihnen kodierten Proteinen erscheinen vor allem CD205, CD209a und C1q interessant, da in der Literatur relativ viel über deren immunologische Bedeutung beschrieben ist. Zusammenfassend kann man feststellen, dass die drei genannten Proteine und deren bekannte Effekte im Rahmen der konstitutiven CD40-Expression in DC-LMP1/CD40-Mäusen gut in unsere Beobachtung in den durchgeführten Versuchen passen. Vermutlich hängen die dysregulierten Genexpressionen direkt mit der konstitutiven CD40-Expression zusammen. Für CD205 und C1q sind direkte Zusammenhänge mit Reifungssignalen über CD40 auf DC beschrieben.

Für den vorliegenden Versuch wurden wie bereits beschrieben BMDC aus hämatopoetischen Vorläuferzellen mittels Stimulation durch GM-CSF gewonnen. Diese etablierte Methode ermöglicht es, große Mengen an DC zu gewinnen. Es muss hierbei erwähnt werden, dass die Zellzahlen dieses Zelltyps *in vivo* sehr gering sind. Darüber hinaus kann durch die beschriebene Kultivierung keine reine Suspension an DC gewonnen werden. Da auch Makrophagen CD11c und MHC-II exprimieren, können die beiden Zelltypen durchflusszytometrisch schwer voneinander unterschieden werden (140). Im Bezug auf die erfolgte Genexpressionsanalyse mittels Microarray ergibt sich hier also eine

gewisse Wahrscheinlichkeit dass eine Durchmischung der beiden Zelltypen stattgefunden hat und nicht allein die Effekte in DC abgebildet wurden.

5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit wird ein neues spontanes Colitis-Modell vorgestellt. Zur Untersuchung der intrinsischen Effekte von CD40 auf DC und deren Rolle in der Induktion von Toleranz und Immunität dienten uns transgene Mäuse, bei denen es über das Fusionsprotein LMP1/CD40 unter der Kontrolle des CD11c-Promoters zu einer konstitutiven CD40-Expression in DC kommt.

Unsere angestellten Beobachtungen zeigen deutlich auf, wie wichtig eine feine Regulierung der DC-Reifung für die Aufrechterhaltung von Toleranz und den Erhalt der Immunhomöostase insbesondere im Bereich von Körperoberflächen wie dem Darm ist. Wie Barthels et al. (38) dargestellt haben führt das konstitutive CD40-Signal in DC-LMP1/CD40-Mäusen dazu, dass CD103⁺ DC von der Lamina propria in die mLN migrieren und dort rasch durch Apoptose zugrunde gehen. CD103⁺ DC haben die einzigartige Fähigkeit iTreg von naiven CD4⁺ T-Zellen zu induzieren (141-143). Passend zu diesen Beobachtungen zeigte sich in DC-LMP1/CD40-Mäusen das verlorene Potenzial, iTreg zu generieren. Die deutliche Erhöhung von IFN- γ ⁻ und IFN- γ ⁺ IL17⁺ T-Zellen im mLN ist Ausdruck des Zusammenbruchs der Immunhomöostase in DC-LMP1/CD40-Mäusen und führt zur Entstehung der Colitis. In dieser Arbeit wird die verminderte Proliferation von CD8⁺ T-Zellen in der Milz beschrieben, was auf das erhaltene Potenzial zur Toleranzinduktion in einer sterilen Umgebung hinweist. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass das Wegfallen des mikrobiellen Stimulus in mit Antibiotika behandelten DC-LMP1/CD40-Mäusen dazu führt, dass es zu weniger Proliferation von CD4⁺ T-Zellen kommt und die Mäuse daher nicht an Colitis erkranken.

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch zwei weitere Publikationen unserer Arbeitsgruppe. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Krankheitsentstehung in DC-LMP1/CD40-Mäusen abhängig von einzelnen Komponenten des Darmmikrobioms ist. So wurde ein *Helicobacter hepaticus* spezifisches Antigen detektiert, in dessen Abwesenheit die Mäuse nur milde Symptome entwickelten und der Krankheitsverlauf nicht tödlich war (144). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung der CD40-getriggerten

Colitis abhängig vom Mausstamm ist. So erkrankten transgene Mäuse, die nicht wie in unserem Mausmodell auf einem C57Bl/6-Hintergrund gezüchtet wurden, sondern auf einem Balb/c-Hintergrund gar nicht, während transgene C57Bl/6 x Balb/c-Mäuse nur eine geringe Colitis aufwiesen und der Krankheitsverlauf nicht tödlich war (145).

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zeigten interessante Veränderungen in BMDC von DC-LMP1/CD40-Mäusen. Hier ist insbesondere die erhöhte Expression von CD205 und die erniedrigte Expression von C1q zu erwähnen. Beide Expressionsveränderungen können dazu beitragen, dass das immunologische Gleichgewicht im Darm von DC-LMP1/CD40-Mäusen zusammenbricht und es zur Entstehung der Colitis kommt. Zur Untersuchung der genauen Zusammenhänge wären hier noch weitere Versuche nötig. Insbesondere muss dem Umstand Rechnung getragen werden, dass für die Untersuchung mittels GM-CSF-Kulturen keine reine BMDC-Suspension gewonnen werden kann und dieser Zelltyp *in vivo* selten vorkommt (140). Für die künftige Forschung an DC wäre eine Kulturmethode, die homogene DC-Zellsuspensionen generiert, von großer Bedeutung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass DC, die durch CD40 aktiviert werden, nicht voll gereift sind, was zuvor bereits bei *in vitro* Versuchen postuliert worden war (76). Stattdessen befinden sie sich in einem Reifezustand, in dem sie sehr sensitiv auf zusätzliche Stimuli, wie sie im Darm vorliegen, reagieren. Sie verlieren also die Fähigkeit Toleranz zu induzieren an Orten, wo es aufgrund von konstanten mikrobiellen Triggern besonders wichtig ist, was zu Autoimmunität führt.

Es sind bereits große Fortschritte im Verständnis von DC und deren Entwicklung, Differenzierung und Funktion gemacht worden. Die vorliegenden Ergebnisse können dabei helfen, das Verständnis über die Regulation von Toleranz und Immunität durch DC zu verbessern. Eine vielversprechende Herausforderung für die Zukunft ist es, die bisher verstandenen Zusammenhänge und Funktionsweisen von DC in der Maus auf die menschliche Physiologie zu übertragen, um neue Therapieoptionen mittels DC-Impfungen gegen Autoimmun- und Tumorerkrankungen zu entwickeln.

Im Hinblick auf chronisch-entzündliche Darmerkrankungen ist die Entwicklung neuer Therapien, die sich auf das Mikrobiom des Darmes fokussieren, bereits erfolgversprechend. In den meisten gängigen Colitis-Modellen in der Maus, inklusive unserem Modell, ist die Entwicklung der Krankheit abhängig von der Darmflora. So entsteht keine Inflammation des Magen-Darm-Traktes, wenn die Darmflora mittels Antibiotika depletiert wurde (146-148). Bei Patienten mit chronisch-entzündlichen

Darmerkrankungen kann eine ausgeprägte Dysbiose der Darmflora festgestellt werden (149-151). Dies unterstreicht die Bedeutung der Darmflora für die Entstehung von entzündlichen Darmerkrankungen. Neben Studien, die die Effekte von Antibiotika und Probiotika untersuchen, rückt die fäkale Mikrobiota-Transplantation (FMS) dabei immer mehr in den Vordergrund. Sie wird bereits erfolgreich bei der rekurrenden Clostridium-difficile-assoziierten Colitis angewendet (152). Auch bei der Colitis ulcerosa gibt es vielversprechende Daten zur Remission nach wiederholt durchgeführter FMS (153). Wie von Friedrich et al. (144) gezeigt, könnte auch die Elimination einzelner Bestandteile des Darmmikrobioms, die als mitverursachend für die Krankheitsentstehung gelten, ein interessanter Therapieansatz sein. Neben der bereits intensiven Erforschung der immunologischen Abläufe bei der Entstehung von entzündlichen Darmerkrankungen kann ein verbessertes Verständnis über die Zusammensetzung der Darmflora und deren Effekte auf Immunzellen wie DC zur Etablierung neuer Therapieansätze beitragen.

6 Literaturverzeichnis

1. Lee AW, Wang N, Hornell TMC, Harding JJ, Deshpande C, Hertel L, et al. Human cytomegalovirus decreases constitutive transcription of MHC class II genes in mature Langerhans cells by reducing CIITA transcript levels. *Molecular Immunology*. 2011;48(9–10):1160-7.
2. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137(5):1142-62.
3. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med*. 1974;139(2):380-97.
4. Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med*. 1976;143(5):1283-8.
5. Bevan MJ. Cross-priming. *Nat Immunol*. 2006;7(4):363-5.
6. Rock KL. The ins and outs of cross-presentation. *Nat Immunol*. 2003;4(10):941-3.
7. Schuler G, Romani N, Steinman RM. A comparison of murine epidermal Langerhans cells with spleen dendritic cells. *J Invest Dermatol*. 1985;85(1 Suppl):99s-106s.
8. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
9. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol*. 2004;5(12):1219-26.
10. Cao W, Bover L. Signaling and ligand interaction of ILT7: receptor-mediated regulatory mechanisms for plasmacytoid dendritic cells. *Immunol Rev*. 2010;234(1):163-76.
11. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000;404(6774):193-7.
12. Manz MG, Traver D, Akashi K, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, et al. Dendritic Cell Development from Common Myeloid Progenitors. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;938(1):167-74.

13. Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM, Yao K, et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science*. 2009;324(5925):392-7.
14. Schmid MA, Kingston D, Boddupalli S, Manz MG. Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment. *Immunol Rev*. 2010;234(1):32-44.
15. Steinman RM, Idoyaga J. Features of the dendritic cell lineage. *Immunol Rev*. 2010;234(1):5-17.
16. Crowley M, Inaba K, Witmer-Pack M, Steinman RM. The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cell Immunol*. 1989;118(1):108-25.
17. Bursch LS, Wang L, Igyarto B, Kissenpfennig A, Malissen B, Kaplan DH, et al. Identification of a novel population of Langerin⁺ dendritic cells. *J Exp Med*. 2007;204(13):3147-56.
18. del Rio ML, Rodriguez-Barbosa JI, Kremmer E, Forster R. CD103⁻ and CD103⁺ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Immunol*. 2007;178(11):6861-6.
19. Bachem A, Hartung E, Guttler S, Mora A, Zhou X, Hegemann A, et al. Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation. *Front Immunol*. 2012;3:214.
20. Crozat K, Guiton R, Contreras V, Feuillet V, Dutertre CA, Ventre E, et al. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha⁺ dendritic cells. *J Exp Med*. 2010;207(6):1283-92.
21. den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med*. 2000;192(12):1685-96.
22. Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, et al. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103⁺ dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009;10(5):488-95.
23. Reis e Sousa C, Hieny S, Scharon-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med*. 1997;186(11):1819-29.
24. 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*. 1993;260(5107):547-9.

25. Wu Y, Tian Z, Wei H. Developmental and Functional Control of Natural Killer Cells by Cytokines. *Front Immunol.* 2017;8:930.
26. Wu L, Shortman K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol.* 2005;17(4):304-12.
27. Lewis KL, Caton ML, Bogunovic M, Greter M, Grajkowska LT, Ng D, et al. Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine. *Immunity.* 2011;35(5):780-91.
28. Persson EK, Uronen-Hansson H, Semmrich M, Rivollier A, Hagerbrand K, Marsal J, et al. IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. *Immunity.* 2013;38(5):958-69.
29. Schlitzer A, McGovern N, Teo P, Zelante T, Atarashi K, Low D, et al. IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity.* 2013;38(5):970-83.
30. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpheller C, Yamazaki S, et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science.* 2007;315(5808):107-11.
31. Guilliams M, Dutertre CA, Scott CL, McGovern N, Sichien D, Chakarov S, et al. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity.* 2016;45(3):669-84.
32. Granot T, Senda T, Carpenter DJ, Matsuoka N, Weiner J, Gordon CL, et al. Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity.* 2017;46(3):504-15.
33. Proietto AI, van Dommelen S, Zhou P, Rizzitelli A, D'Amico A, Steptoe RJ, et al. Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(50):19869-74.
34. Brocker T, Riedinger M, Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med.* 1997;185(3):541-50.
35. Ohnmacht C, Pullner A, King SB, Drexler I, Meier S, Brocker T, et al. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med.* 2009;206(3):549-59.
36. Birnberg T, Bar-On L, Sapozhnikov A, Caton ML, Cervantes-Barragan L, Makia D, et al. Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome. *Immunity.* 2008;29(6):986-97.

37. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:305-34.
38. Barthels C, Ogrinc A, Steyer V, Meier S, Simon F, Wimmer M, et al. CD40-signalling abrogates induction of RORgammat(+) Treg cells by intestinal CD103(+) DCs and causes fatal colitis. *Nat Commun.* 2017;8:14715.
39. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2009;361(21):2066-78.
40. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2002;347(6):417-29.
41. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology.* 2012;142(1):46-54 e42; quiz e30.
42. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2007;448(7152):427-34.
43. Henderson P, Hansen R, Cameron FL, Gerasimidis K, Rogers P, Bisset WM, et al. Rising incidence of pediatric inflammatory bowel disease in Scotland. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(6):999-1005.
44. Benchimol EI, Fortinsky KJ, Gozdyra P, Van den Heuvel M, Van Limbergen J, Griffiths AM. Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review of international trends. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(1):423-39.
45. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer. *JAMA.* 1984;251(1):73-9.
46. Brown SR, Coviello LC. Extraintestinal Manifestations Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Surg Clin North Am.* 2015;95(6):1245-59, vii.
47. Day AS, Whitten KE, Lemberg DA, Clarkson C, Vitug-Sales M, Jackson R, et al. Exclusive enteral feeding as primary therapy for Crohn's disease in Australian children and adolescents: a feasible and effective approach. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006;21(10):1609-14.
48. Borrelli O, Cordischi L, Cirulli M, Paganelli M, Labalestra V, Uccini S, et al. Polymeric diet alone versus corticosteroids in the treatment of active pediatric Crohn's disease: a randomized controlled open-label trial. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006;4(6):744-53.
49. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2011;474(7351):307-17.

50. Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, Schreiber S. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14(7):968-76.
51. Brant SR. Update on the heritability of inflammatory bowel disease: the importance of twin studies. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(1):1-5.
52. de Lange KM, Moutsianas L, Lee JC, Lamb CA, Luo Y, Kennedy NA, et al. Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. *Nat Genet.* 2017;49(2):256-61.
53. Degenhardt F, Franke A. Genetik des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa. *Der Gastroenterologe.* 2017;12(1):38-48.
54. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2012;491(7422):119-24.
55. Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet.* 2015;47(9):979-86.
56. Uhlig HH, Schwerd T. From Genes to Mechanisms: The Expanding Spectrum of Monogenic Disorders Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2016;22(1):202-12.
57. Uhlig HH. Monogenic diseases associated with intestinal inflammation: implications for the understanding of inflammatory bowel disease. *Gut.* 2013;62(12):1795-805.
58. Uhlig HH, Muise AM. Clinical Genomics in Inflammatory Bowel Disease. *Trends Genet.* 2017;33(9):629-41.
59. Uhlig HH, Schwerd T, Koletzko S, Shah N, Kammermeier J, Elkadri A, et al. The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2014;147(5):990-1007 e3.
60. Levine A, Koletzko S, Turner D, Escher JC, Cucchiara S, de Ridder L, et al. ESPGHAN revised porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014;58(6):795-806.
61. Turner D, Levine A, Escher JC, Griffiths AM, Russell RK, Dignass A, et al. Management of pediatric ulcerative colitis: joint ECCO and ESPGHAN evidence-based consensus guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;55(3):340-61.

62. Kotlarz D, Beier R, Murugan D, Diestelhorst J, Jensen O, Boztug K, et al. Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology*. 2012;143(2):347-55.
63. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.
64. Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol*. 2013;4:129.
65. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2005;129(1):50-65.
66. Danese S, Sans M, Fiocchi C. The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004;53(7):1035-43.
67. Kasran A, Boon L, Wortel CH, Hogezaand RA, Schreiber S, Goldin E, et al. Safety and tolerability of antagonist anti-human CD40 Mab ch5D12 in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;22(2):111-22.
68. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994;179(4):1109-18.
69. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med*. 1994;180(4):1263-72.
70. Pinchuk LM, Polacino PS, Agy MB, Klaus SJ, Clark EA. The role of CD40 and CD80 accessory cell molecules in dendritic cell-dependent HIV-1 infection. *Immunity*. 1994;1(4):317-25.
71. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*. 1996;184(2):747-52.
72. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*. 2001;194(6):769-79.
73. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med*. 2002;196(12):1627-38.

74. Ahonen CL, Doxsee CL, McGurran SM, Riter TR, Wade WF, Barth RJ, et al. Combined TLR and CD40 triggering induces potent CD8⁺ T cell expansion with variable dependence on type I IFN. *J Exp Med*. 2004;199(6):775-84.
75. Sanchez PJ, McWilliams JA, Haluszczak C, Yagita H, Kedl RM. Combined TLR/CD40 stimulation mediates potent cellular immunity by regulating dendritic cell expression of CD70 in vivo. *J Immunol*. 2007;178(3):1564-72.
76. Schulz O, Edwards AD, Schito M, Aliberti J, Manickasingham S, Sher A, et al. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity*. 2000;13(4):453-62.
77. Kimura K, Moriwaki H, Nagaki M, Saio M, Nakamoto Y, Naito M, et al. Pathogenic role of B cells in anti-CD40-induced necroinflammatory liver disease. *Am J Pathol*. 2006;168(3):786-95.
78. Homig-Holzel C, Hojer C, Rastelli J, Casola S, Strobl LJ, Muller W, et al. Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF-kappaB pathway and promotes lymphomagenesis. *J Exp Med*. 2008;205(6):1317-29.
79. Kleinhammer A, Deussing J, Wurst W, Kuhn R. Conditional RNAi in mice. *Methods*. 2011;53(2):142-50.
80. Caton ML, Smith-Raska MR, Reizis B. Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8⁻ dendritic cells in the spleen. *J Exp Med*. 2007;204(7):1653-64.
81. Gires O, Zimmer-Strobl U, Gonnella R, Ueffing M, Marschall G, Zeidler R, et al. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J*. 1997;16(20):6131-40.
82. Mitchell T, Sugden B. Stimulation of NF-kappa B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *J Virol*. 1995;69(5):2968-76.
83. Kieser A, Kilger E, Gires O, Ueffing M, Kolch W, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *EMBO J*. 1997;16(21):6478-85.
84. Meier S. Maturation status of dendritic cells controls induction of tolerance versus immunity
2011.
85. Yasui T, Muraoka M, Takaoka-Shichijo Y, Ishida I, Takegahara N, Uchida J, et al. Dissection of B cell differentiation during primary immune responses in mice with altered CD40 signals. *Int Immunol*. 2002;14(3):319-29.

86. Busch LK, Bishop GA. The EBV transforming protein, latent membrane protein 1, mimics and cooperates with CD40 signaling in B lymphocytes. *J Immunol.* 1999;162(5):2555-61.
87. Hatzivassiliou E, Miller WE, Raab-Traub N, Kieff E, Mosialos G. A fusion of the EBV latent membrane protein-1 (LMP1) transmembrane domains to the CD40 cytoplasmic domain is similar to LMP1 in constitutive activation of epidermal growth factor receptor expression, nuclear factor-kappa B, and stress-activated protein kinase. *J Immunol.* 1998;160(3):1116-21.
88. Oxenius A, Bachmann MF, Zinkernagel RM, Hengartner H. Virus-specific MHC-class II-restricted TCR-transgenic mice: effects on humoral and cellular immune responses after viral infection. *Eur J Immunol.* 1998;28(1):390-400.
89. Brandle D, Brduscha-Riem K, Hayday AC, Owen MJ, Hengartner H, Pircher H. T cell development and repertoire of mice expressing a single T cell receptor alpha chain. *Eur J Immunol.* 1995;25(9):2650-5.
90. Pircher H, Burki K, Lang R, Hengartner H, Zinkernagel RM. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature.* 1989;342(6249):559-61.
91. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett.* 2006;28(19):1601-13.
92. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine.* 1992;176(6):1693-702.
93. Bachmann MF, Oxenius A, Speiser DE, Mariathasan S, Hengartner H, Zinkernagel RM, et al. Peptide-induced T cell receptor down-regulation on naive T cells predicts agonist/partial agonist properties and strictly correlates with T cell activation. *Eur J Immunol.* 1997;27(9):2195-203.
94. Weidt G, Deppert W, Utermohlen O, Heukeshoven J, Lehmann-Grube F. Emergence of virus escape mutants after immunization with epitope vaccine. *J Virol.* 1995;69(11):7147-51.
95. Gronski MA, Boulter JM, Moskophidis D, Nguyen LT, Holmberg K, Elford AR, et al. TCR affinity and negative regulation limit autoimmunity. *Nat Med.* 2004;10(11):1234-9.
96. Speiser DE, Miranda R, Zakarian A, Bachmann MF, McKall-Faienza K, Odermatt B, et al. Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *J Exp Med.* 1997;186(5):645-53.

97. Probst HC, Tschannen K, Odermatt B, Schwendener R, Zinkernagel RM, Van Den Broek M. Histological analysis of CD11c-DTR/GFP mice after in vivo depletion of dendritic cells. *Clin Exp Immunol.* 2005;141(3):398-404.
98. Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T, et al. In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity.* 2002;17(2):211-20.
99. Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven DE, George MD, Wilson RP, Winter SE, et al. Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes *Salmonella* dissemination from the gut. *Nat Med.* 2008;14(4):421-8.
100. O'Connor W, Jr., Kamanaka M, Booth CJ, Town T, Nakae S, Iwakura Y, et al. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol.* 2009;10(6):603-9.
101. Yang XO, Chang SH, Park H, Nurieva R, Shah B, Acero L, et al. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med.* 2008;205(5):1063-75.
102. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4⁺ T cells. *Immunity.* 1994;1(7):553-62.
103. Ahern PP, Schiering C, Buonocore S, McGeachy MJ, Cua DJ, Maloy KJ, et al. Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. *Immunity.* 2010;33(2):279-88.
104. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007;204(8):1849-61.
105. Li CF, Liu TT, Chuang IC, Chen YY, Fang FM, Chan TC, et al. PLCB4 copy gain and PLCss4 overexpression in primary gastrointestinal stromal tumors: Integrative characterization of a lipid-catabolizing enzyme associated with worse disease-free survival. *Oncotarget.* 2017;8(12):19997-20010.
106. Kakiuchi T, Takahara T, Kasugai Y, Arita K, Yoshida N, Karube K, et al. Modeling mesothelioma utilizing human mesothelial cells reveals involvement of phospholipase-C beta 4 in YAP-active mesothelioma cell proliferation. *Carcinogenesis.* 2016;37(11):1098-109.
107. van de Nes JAP, Koelsche C, Gessi M, Moller I, Sucker A, Scolyer RA, et al. Activating CYSLTR2 and PLCB4 Mutations in Primary Leptomeningeal Melanocytic Tumors. *J Invest Dermatol.* 2017;137(9):2033-5.
108. Wu S, Zhang W, Shen D, Lu J, Zhao L. PLCB4 upregulation is associated with unfavorable prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. *Oncol Lett.* 2019;18(6):6057-65.

109. Lyu S, Jiang C, Xu R, Huang Y, Yan S. INHBA upregulation correlates with poorer prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2018;10:1585-96.
110. Sutherland TE, Logan N, Ruckerl D, Humbles AA, Allan SM, Papayannopoulos V, et al. Chitinase-like proteins promote IL-17-mediated neutrophilia in a tradeoff between nematode killing and host damage. *Nat Immunol.* 2014;15(12):1116-25.
111. Shrimpton RE, Butler M, Morel AS, Eren E, Hue SS, Ritter MA. CD205 (DEC-205): a recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Mol Immunol.* 2009;46(6):1229-39.
112. Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, et al. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med.* 2004;199(6):815-24.
113. Mahnke K, Qian Y, Knop J, Enk AH. Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood.* 2003;101(12):4862-9.
114. Sabbagh L, Pulle G, Liu Y, Tsitsikov EN, Watts TH. ERK-dependent Bim modulation downstream of the 4-1BB-TRAF1 signaling axis is a critical mediator of CD8 T cell survival in vivo. *J Immunol.* 2008;180(12):8093-101.
115. Arron JR, Pewzner-Jung Y, Walsh MC, Kobayashi T, Choi Y. Regulation of the subcellular localization of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)2 by TRAF1 reveals mechanisms of TRAF2 signaling. *J Exp Med.* 2002;196(7):923-34.
116. Durkop H, Foss HD, Demel G, Klotzbach H, Hahn C, Stein H. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 is overexpressed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus-transformed lymphoid cells. *Blood.* 1999;93(2):617-23.
117. Izban KF, Ergin M, Martinez RL, Alkan S. Expression of the tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) 1 and 2 is a characteristic feature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Mod Pathol.* 2000;13(12):1324-31.
118. Edilova MI, Abdul-Sater AA, Watts TH. TRAF1 Signaling in Human Health and Disease. *Front Immunol.* 2018;9:2969.
119. Fehres CM, van Beelen AJ, Bruijns SCM, Ambrosini M, Kalay H, Bloois LV, et al. In situ Delivery of Antigen to DC-SIGN(+)CD14(+) Dermal Dendritic Cells Results in Enhanced CD8(+) T-Cell Responses. *J Invest Dermatol.* 2015;135(9):2228-36.
120. Soilleux EJ, Morris LS, Leslie G, Chehimi J, Luo Q, Levroney E, et al. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc Biol.* 2002;71(3):445-57.

121. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*. 2000;100(5):575-85.
122. Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y. The physiological role of DC-SIGN: a tale of mice and men. *Trends Immunol*. 2013;34(10):482-6.
123. Park CG, Takahara K, Umemoto E, Yashima Y, Matsubara K, Matsuda Y, et al. Five mouse homologues of the human dendritic cell C-type lectin, DC-SIGN. *Int Immunol*. 2001;13(10):1283-90.
124. Schetters STT, Kruijssen LJW, Crommentuijn MHW, Kalay H, Ochando J, den Haan JMM, et al. Mouse DC-SIGN/CD209a as Target for Antigen Delivery and Adaptive Immunity. *Front Immunol*. 2018;9:990.
125. Cheong C, Matos I, Choi JH, Dandamudi DB, Shrestha E, Longhi MP, et al. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell*. 2010;143(3):416-29.
126. Unger WW, Mayer CT, Engels S, Hesse C, Perdicchio M, Puttur F, et al. Antigen targeting to dendritic cells combined with transient regulatory T cell inhibition results in long-term tumor regression. *Oncoimmunology*. 2015;4(8):e970462.
127. Maltais LJ, Lovering RC, Tarantin AV, Colonna M, Ravetch JV, Dalla-Favera R, et al. New nomenclature for Fc receptor-like molecules. *Nat Immunol*. 2006;7(5):431-2.
128. Chikaev NA, Bykova EA, Najakshin AM, Mechetina LV, Volkova OY, Peklo MM, et al. Cloning and characterization of the human FCRL2 gene. *Genomics*. 2005;85(2):264-72.
129. Mechetina LV, Najakshin AM, Volkova OY, Guselnikov SV, Faizulin RZ, Alabyev BY, et al. FCRL, a novel member of the leukocyte Fc receptor family possesses unique structural features. *Eur J Immunol*. 2002;32(1):87-96.
130. Ehrhardt GR, Cooper MD. Immunoregulatory roles for fc receptor-like molecules. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011;350:89-104.
131. Davis RS. Fc receptor-like molecules. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:525-60.
132. Sanicola M, Hession C, Worley D, Carmillo P, Ehrenfels C, Walus L, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent RET activation can be mediated by two different cell-surface accessory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(12):6238-43.
133. Jensen CT, Ahsberg J, Sommarin MNE, Strid T, Somasundaram R, Okuyama K, et al. Dissection of progenitor compartments resolves developmental trajectories in B-lymphopoiesis. *J Exp Med*. 2018;215(7):1947-63.

134. Li Z, Xie J, Fei Y, Gao P, Xie Q, Gao W, et al. GDNF family receptor alpha 2 promotes neuroblastoma cell proliferation by interacting with PTEN. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;510(3):339-44.
135. Kishore U, Gaboriaud C, Waters P, Shrive AK, Greenhough TJ, Reid KB, et al. C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. *Trends Immunol.* 2004;25(10):551-61.
136. Csomor E, Bajtaj Z, Sandor N, Kristof K, Arlaud GJ, Thiel S, et al. Complement protein C1q induces maturation of human dendritic cells. *Mol Immunol.* 2007;44(13):3389-97.
137. Castellano G, Woltman AM, Nauta AJ, Roos A, Trouw LA, Seelen MA, et al. Maturation of dendritic cells abrogates C1q production in vivo and in vitro. *Blood.* 2004;103(10):3813-20.
138. Reis ES, Barbuto JA, Isaac L. Complement components, regulators and receptors are produced by human monocyte-derived dendritic cells. *Immunobiology.* 2007;212(3):151-7.
139. Lood C, Gullstrand B, Truedsson L, Olin AI, Alm GV, Ronnblom L, et al. C1q inhibits immune complex-induced interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells: a novel link between C1q deficiency and systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(10):3081-90.
140. Helft J, Böttcher J, Chakravarty P, Zelenay S, Huotari J, Schraml Barbara U, et al. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+)Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity.* 2015;42(6):1197-211.
141. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med.* 2007;204(8):1757-64.
142. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med.* 2007;204(8):1775-85.
143. Esterhazy D, Loschko J, London M, Jove V, Oliveira TY, Mucida D. Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral T(reg) cells and tolerance. *Nat Immunol.* 2016;17(5):545-55.
144. Friedrich V, Forne I, Matzek D, Ring D, Popper B, Jochum L, et al. *Helicobacter hepaticus* is required for immune targeting of bacterial heat shock protein 60 and fatal colitis in mice. *Gut Microbes.* 2021;13(1):1-20.

145. Ogrinc Wagner A, Friedrich V, Barthels C, Marconi P, Blutke A, Brombacher F, et al. Strain specific maturation of Dendritic cells and production of IL-1beta controls CD40-driven colitis. *PLoS One*. 2019;14(1):e0210998.
146. Balish E, Warner T. *Enterococcus faecalis* induces inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice. *Am J Pathol*. 2002;160(6):2253-7.
147. Waidmann M, Bechtold O, Frick JS, Lehr HA, Schubert S, Dobrindt U, et al. *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology*. 2003;125(1):162-77.
148. Stepankova R, Powrie F, Kofronova O, Kozakova H, Hudcovic T, Hrcir T, et al. Segmented filamentous bacteria in a defined bacterial cocktail induce intestinal inflammation in SCID mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(10):1202-11.
149. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(34):13780-5.
150. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vazquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, et al. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe*. 2014;15(3):382-92.
151. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol*. 2012;13(9):R79.
152. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. 2013;368(5):407-15.
153. Sunkara T, Rawla P, Ofosu A, Gaduputi V. Fecal microbiota transplant - a new frontier in inflammatory bowel disease. *J Inflamm Res*. 2018;11:321-8.

7 Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei Prof. Dr. Thomas Brocker dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem Projekt teilnehmen zu dürfen und diese Arbeit zu verfassen. Er stand mir stets mit gutem Rat und konstruktiven Vorschlägen zur Verbesserung meiner Arbeit zur Seite und war dabei bis zum Schluss sehr geduldig.

Des Weiteren gilt mein großer Dank Dr. Christian Barthels, der mich als mein Betreuer im Labor als blutigen Anfänger ertragen musste, der mir das wissenschaftliche Arbeiten nähergebracht hat und der mich bis zur Korrektur dieser Arbeit mit viel Geduld und guten Ratschlägen begleitet hat.

Vielen Dank auch an die gesamte AG Brocker für das nette Miteinander, die Unterstützung, die lockere Atmosphäre im Labor und die schönen gemeinsamen Feiern und Abende.

Danke an Dr. Tobias Straub für die Auswertung der Genexpressionsanalyse.

Mein Dank gilt besonders auch Andrea Bol und ihrem Team für die hervorragende Pflege und Betreuung der Versuchstiere, sowie die netten Gespräche zwischen Tür und Angel.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mich stets in meinen Interessen unterstützt haben und mich bedingungslos auf meinem Weg begleiten. Dafür und für Eure Zuneigung kann ich nicht genug dankbar sein.

Meiner Schwester Charlotte danke ich, dass sie mir immer als wertvolle Gesprächspartnerin zur Seite steht. Ohne Dich hätte ich diese Arbeit vermutlich nicht abgeschlossen. Du bist mit Zielstrebigkeit vorangegangen und hast mich mitgerissen. Ich bin dankbar für unsere Verbundenheit.

Last, but not least möchte ich meiner Frau Judith danken für die unendliche Geduld, wenn ich mal wieder vom Schreiben an der Arbeit gestresst war oder mich dem Familienleben entzogen habe. Danke, dass Du mich unterstützt und immer daran geglaubt hast, dass diese Arbeit irgendwann fertig sein würde.