

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der  
Universität Tübingen

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**B-Zell-vermittelte Immunregulation - Mechanismen zur  
Toleranzentwicklung durch den Pathobionten *E. coli***

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Trostel, Constanze Katharina**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. J.-S. Frick  
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C. Gille

Tag der Disputation: 04.09.2020

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	10
1.1 Das intestinale Mikrobiom	10
1.2 Angeborenes und adaptives Immunsystem: B-, T- und dendritische Zellen	12
1.3 Klinische Bedeutung bei Autoimmunerkrankungen	17
1.4 Zielsetzung	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Geräte	23
2.1.2 Verbrauchsgegenstände	24
2.1.3 Mäuse	25
2.1.4 Bakterien	25
2.1.5 Medien und Puffer	25
2.1.6 Durchflusszytometrie: Antikörper	27
2.1.7 Antikörper zur Fluoreszenzmikroskopie	30
2.1.8 Chemikalien zur B-Zell-Isolation	30
2.1.9 Antikörper, Puffer und Lösungen für ELISAs	31
2.1.10 Sonstige Reagenzien	32
2.1.11 Software	34
2.2 Methoden	35
2.2.1 Versuchstiere	35
2.2.2 Bakterienkultur und Quantifizierung	35
2.2.3 Zellkulturen	36
2.2.4 Fixierung, Färbung und Vorbereitung der Durchflusszytometrie	44
2.2.5 Durchflusszytometrie	47
2.2.6 Auswertung mittels FlowJo und GraphPad Prism	48
2.2.7 Zytokinbestimmung mittels ELISA	50

2.2.8	Fluoreszenzmikroskopie von B-Zellen und dendritischen Zellen	50
3	Ergebnisse	53
3.1	<i>E. coli</i> mpk induziert regulatorische B-Zell-Subtypen	53
3.1.1	B <sub>reg</sub> -Subtypen und andere Oberflächenmarker	53
3.1.2	<i>E. coli</i> mpk-stimulierte B-Zellen produzieren mehr IL-10 und -6	60
3.2	Die Expression regulatorischer Marker wird durch <i>E. coli</i> mpk gesteigert	63
3.3	Regulatorische B-Zellen inhibieren T-Zell-Proliferation und fördern eine anti-inflammatorische Polarisation	67
3.3.1	B <sub>reg</sub> -vermittelte Inhibition der T-Zell-Proliferation	67
3.3.2	<i>E. coli</i> mpk inhibiert Ausbildung des Th1-Phänotyps	71
3.4	Transwell-Co-Kultur mit B-Zellen mindert Maturation dendritischer Zellen	73
3.5	Dreifachkultur mit B- / T- und dendritischen Zellen	82
3.5.1	B <sub>regs</sub> machen den Unterschied: Inhibition der Maturation dendritischer Zellen in der Dreifachkultur	82
3.5.2	Ergebnisse der T-Zell-Analyse	85
3.5.3	<i>E. coli</i> mpk induziert auch in der Dreifachkultur B-Zell-abhängiges IL-10	88
3.6	Kontaktaufnahme zwischen B-Zellen und dendritischen Zellen	90
4	Diskussion	92
4.1	Zusammenfassung	92
4.2	Diskussion der Ergebnisse und Methoden	93
4.2.1	Der Pathobiont <i>E. coli</i> mpk induziert regulatorische B-Zell-Subtypen	93
4.2.2	Einfluss auf andere APZ: B <sub>regs</sub> mindern Maturation dendritischer Zellen	105
4.2.3	B <sub>regs</sub> inhibieren pro-inflammatorische T-Zellen	109
4.2.4	Ausblick	117
5	Zusammenfassung	119
	Literaturverzeichnis:	121
6	Erklärung zum Eigenanteil	135

7	Veröffentlichungen _____	136
8	Danksagung _____	137

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Darstellung der Zeitverläufe der Co-Kultur-Experimente.....	43
Abbildung 2: Exemplarisches Gating mit FlowJo.....	49
Abbildung 3. E. coli mpk-Stimulation ermöglicht ein längeres Überleben der B-Zell-Population in Kultur. ....	56
Abbildung 4. E. coli mpk-Stimulation fördert die regulatorischen B-Zell-Subtypen B10- und T2-MZP-Zellen.....	57
Abbildung 5. E. coli mpk induziert erhöhte Expression von Foxp3, Tim-1 und IgM.....	59
Abbildung 6: Interleukin-10 und -6 werden gesteigert von E. coli mpk-stimulierten B-Zellen sezerniert. ....	62
Abbildung 7. E. coli mpk induziert eine erhöhte Expression von CD73, PD-1-L, Fas-L und Gitr-L bereits nach 24 h.....	65
Abbildung 8. E. coli mpk-stimulierte B-Zellen zeigen ab 48 h Stimulation erhöhte Expressionen von IL-10R, Ebi3, und Tim-1. ....	66
Abbildung 9. B <sub>reg</sub> -vermittelte Inhibition der T-Zell-Proliferation.....	69
Abbildung 10. E. coli mpk-stimulierte B-Zellen fördern die Entwicklung eines anti-inflammatorischen T-Zell-Phänotyps. ....	72
Abbildung 11. Direkte B-Zell-DZ-Co-Kultur zeigt Tendenz zu Inhibition der MHC-II Expression auf DZ. ....	75
Abbildung 12. Transwell-Co-Kultur E. coli mpk-stimulierter B-Zellen mit DZ inhibiert Expression von Maturationsmarkern.....	77
Abbildung 13. Die direkte B-Zell/DZ-Co-Kultur schafft ein anti-inflammatorisches Mikromilieu.....	81
Abbildung 14. B <sub>reg</sub> in der Dreifachkultur inhibieren die DZ-Maturation. ....	84
Abbildung 15. E. coli mpk-stimulierte B-Zellen wirken dem Th1-förderndem Einfluss der E. coli mpk-stimulierten DZ entgegen. ....	87
Abbildung 16. Interleukin-10 bestimmt das Mikromilieu der Zellkulturen.....	89
Abbildung 17. B-Zellen im Fluoreszenzmikroskop.....	91
Abbildung 18. B-Zell-DZ-Co-Kultur.....	91
Abbildung 19. Tolerogene Effekte des Pathobionten E. coli mpk werden über B <sub>regs</sub> vermittelt .....	116

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte .....	23
Tabelle 2: Verbrauchsgegenstände.....	24
Tabelle 3: Mäuse .....	25
Tabelle 4: Bakterien .....	25
Tabelle 5: Medien und Puffer .....	25
Tabelle 6: Durchflusszytometrie: Antikörper .....	27
Tabelle 7: Antikörper zur Fluoreszenzmikroskopie .....	30
Tabelle 8: Chemikalien zur B-Zell-Isolation .....	30
Tabelle 9: Antikörper, Puffer und Lösungen für ELISAs .....	31
Tabelle 10: Sonstige Reagenzien.....	32
Tabelle 11: Software .....	34

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Nährmedium)
KGDZ	Knochenmarksgereifte dendritische Zelle
B <sub>reg</sub>	Regulatorische B-Zelle
<i>B. vulgatus</i> / <i>B. v.</i>	<i>Bacteroides vulgatus</i>
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (immunphänotypische Oberflächenmerkmale)
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (zytoplasmatischer Fluoreszenzfarbstoff)
CpG-Sequenz	Cytosin-Phosphat-Guanin-Sequenz
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4</i> (zytotoxischer T-Lymphozyt-assoziiertes Protein 4)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DZ	dendritische Zelle(n)
EAE	experimentelle Autoimmunenzephalitis
<i>Ebi3</i>	<i>Epstein-Barr virus induced gene 3</i> (Epstein-Barr-Virus induziertes Gen 3)
<i>E. coli</i> / <i>E. c.</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eF	e Fluor (fluoreszente Farbstoffe)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
etc.	<i>et cetera</i> (und so weiter)
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)

FasL	<i>First apoptosis signal ligand</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMO	<i>fluorescence minus one</i>
Foxp3	<i>Forkhead Box Protein 3</i>
FSC-A	<i>Forward Scatter Area</i> (Vorwärtsstreuung: Fläche)
FSC-H	<i>Forward Scatter Height</i> (Vorwärtsstreuung: Höhe)
g	Erdbeschleunigung
GitrL	<i>Glucocorticoid-induced TNF receptor related protein ligand</i> (Glukokortikoid-induzierter TNF-Rezeptor-Ligand)
Gitr	<i>Glucocorticoid-induced TNF receptor</i> (Glukokortikoid-induzierter TNF-Rezeptor)
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor)
GVO	Genetisch veränderter Organismus
h	Stunde
<i>H. hepaticus</i>	<i>Helicobacter hepaticus</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hi	<i>high</i> (bezogen auf die Expression)
HRP	<i>Horse raddish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
l	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i> (Nährmedium) Luria Bertani
lo	<i>low</i> (bezogen auf die Expression)
mAb	<i>Monoclonal Antibody</i> (monoklonaler Antikörper)
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Seperation</i> (Magnet-aktivierte Zellseparierung)
MAMP	<i>Microbe associated pattern</i> (Mikroben-assoziierte Muster)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Haupthisto-

	kompatibilitätskomplex)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> (Vielzahl der Infektion)
mol	Einheit der Stoffmenge (1 mol entspricht $6,022 \times 10^{23}$ Teilchen)
mpk	Max-von-Pettenkofer-Institute Munich
MS	Multiple Sklerose
Nea	<i>Non essential amino acids</i> (nicht-essenzielle Aminosäuren) (nichtessenzielle Aminosäuren)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
OT-II	OVA-spezifische transgene Mäuse
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PD-1-L	<i>Programmed-death-1-Ligand</i> (programmierter Todesligand 1)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Proteinkomplex
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
P/S	Penicillin/Streptomycin
rER	Raues endoplasmatisches Retikulum
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Medium)
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SPF	Speziell pathogenfrei
SSC-A	<i>Side Scatter Area</i> (seitliche Streuung: Fläche)
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i> (Signaltransduktor und Transkriptionsaktivator 1)
T6SS	Typ VI Sekretionssystem

Tab.	Tabelle
TGF	<i>Tumorgrowthfactor</i> (Tumor-Wachstumsfaktor)
Tim-1	<i>T cell immunoglobulin and mucin domain protein 1</i> (T-Zell-Immunglobulin- und Muzin-Domänen-Protein 1)
TLR <sup>-/-</sup>	Toll-like-Rezeptor Knockout
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Tumornekrosefaktor)
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i> (Tumornekrosefaktor-rezeptor)
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser (demineralisiertes Wasser)
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Das intestinale Mikrobiom

Nach dem Abschluss des *Human Genome Project* im Jahr 2003 wandte sich die Wissenschaft 2007 auf eine Initiative des amerikanischen *National Health Institute* (NIH) erneut einem weiteren Großprojekt mit multimodalem Ansatz zu: dem *Human Microbiome Project*. In den erklärten Zielen wurde angestrebt, eine standardisierte Datenbank über die Komponenten des Mikrobioms zu schaffen und Assoziationen dieser Zusammensetzung zu dem Status von Krankheit oder Gesundheit aufzudecken (Turnbaugh et al., 2007).

Als Mikrobiom wird im Allgemeinen die Gesamtheit aller Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen bezeichnet, die einen komplexeren Organismus besiedelt. Schätzungen zufolge besteht das gesamte Mikrobiom aus  $3,8 \times 10^{13}$  Zellen und steht damit  $3 \times 10^{13}$  humanen Körperzellen gegenüber (Sender et al., 2016). Round and Mazmanian (2009) gehen in ihrem *Nature Immunology*-Artikel sogar so weit, den Menschen nur als Grundgerüst für die Etablierung verschiedenster mikrobieller Ökosysteme zu bezeichnen. Die Zusammensetzung des Mikrobioms unterscheidet sich dabei nicht nur von Spezies zu Spezies, sondern variiert auch zwischen Individuen derselben Art (Schloissnig et al., 2013). Trotzdem gibt es dabei übereinstimmende Muster, die bspw. beim Menschen mit der Genetik, dem Lebensalter oder ähnlichen Lebensumständen assoziiert sind (vgl. The Human Microbiome Project et al., 2012, Pickard et al., 2017, Gill et al., 2006). Bei Säugetieren sind die Haut, die Atemwege, der Genitaltrakt und der Gastrointestinaltrakt besonders dicht von Mikroorganismen besiedelt (Peterson et al., 2015). Da die Schleimhäute im Mund-/ Rachenraum und dem Darm durchlässiger sind als die oberflächliche Felder- und Leistenhaut, findet hier ein besonders enger Kontakt und Austausch zwischen Wirt und Mikrobiom statt. In Folge kann es zu einer klassischen Symbiose, bei der beide Parteien vom Zusammenleben profitieren, kommen. Der Wirt bietet eine Nische mit optimalen Wachstumsbedingungen und sorgt für Nahrungszufuhr. Im Gegenzug spalten Mikroben Nahrungsbestandteile in resorbierbare Abbauprodukte, produzieren Vitamine und etablieren eine natürliche

Kolonisierungsresistenz gegen pathogene Mikroorganismen. Zusätzlich führt diese Interaktion zu einem ständigen *Priming* des Wirt-Immunsystems zur Aufrechterhaltung einer Immunhomöostase. Umgekehrt beeinflussen Faktoren wie Immunglobuline, Defensine und andere antimikrobielle Stoffe, die durch das Immunsystem und das Darmepithel gebildet werden, die Zusammensetzung der lokalen Darmflora (Liu and Rhoads, 2013, Chairatana and Nolan, 2017).

Die prozentual am häufigsten vorkommenden Spezies des intestinalen Mikrobioms sind die Gram-negativen, obligat anaeroben *Bacteroidetes*, die über Fermentation unverdauliche Kohlenhydrate verarbeiten und unterstützend im hepatobiliären Kreislauf der Gallensäuren wirken. Daher werden besonders große Populationen an *Bacteroidetes* auch in Verbindung mit einer fettreichen Ernährung gebracht (Wu et al., 2011). *Bacteroidetes* machen gemeinsam mit den *Firmicutes* über 90 % der bakteriellen Darmflora aus (Turnbaugh et al., 2009) und sind bei älteren Erwachsenen deutlich stärker vertreten als bei Kindern und Jugendlichen (vgl. Hollister et al., 2015, Mariat et al., 2009). Eine weitere Tatsache, die dazu beiträgt, dass das Mikrobiom jedes Menschen einzigartig ist, ist der horizontale Gentransfer zwischen unterschiedlichen Stämmen der großen Familie der *Bacteroidetes* (Coyne et al., 2014, Lange et al., 2016). Dadurch wird sogar das Genom der Bakterien von der Zusammensetzung des gesamten Mikrobioms beeinflusst. Als einen Vertreter dieser Gruppe haben wir *Bacteroides vulgatus* mpk ausgewählt, der im murinen Darm gesunder Tiere vorkommt. Dem humanen *Bacteroides vulgatus*-Stamm wurden u. a. schon protektive Fähigkeiten bei *E. coli*-induzierter Kolitis in gnotobiotischen IL-2<sup>-/-</sup>-Mäusen nachgewiesen (Waidmann et al., 2003).

Das zu den fakultativ anaeroben *Enterobacteriaceae* zählende Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* existiert phylogenetisch in vier verschiedenen Gruppen. Die typischen Kommensale gehören dabei zur Gruppe A, wohingegen viele extraintestinale und deutlich pathogenere Stämme zur Gruppe B2 zählen (Herzer et al., 1990). Weitere Gruppen sind B1 und D. Die phylogenetischen Gruppen unterscheiden sich durch ihre Virulenz, ihre präferierte Lokalisation (extra-/ intestinal) und spezielle Enzyme, Ribotypen und Gene.

Allerdings können auch die kommensalen *E. coli*-Stämme durch ein verändertes Mikromilieu in und außerhalb des Darms zu Infektionen wie bspw. Harnwegsinfekten führen.

Eine sehr ausführliche Definition und Herleitung des Begriffes Kommensalismus bzw. Kommensale wurde von Casadevall and Pirofski (2000) publiziert. Darin gilt Kommensalismus (*com mensa al* wörtlich übersetzt als „mit am Tisch essend“) als eine Interaktion zwischen Mikroorganismus und Wirt, die dem Wirt keinen nachhaltig bemerkbaren Schaden zufügt, trotzdem aber eine Immunstimulation bewirken kann. Zu betonen ist allerdings, dass dieser Zustand des Nicht-Schadens nicht dauerhaft sein muss, sondern durch Veränderungen in der Mikrobiomzusammensetzung oder des Immunstatus beeinflussbar ist.

Der Begriff Pathobiont wurde erstmals von Mazmanian et al. (2008) definiert als kommensale Bakterien, die potenziell pathogen sein können. Diese stehen den Symbionten gegenüber, unter denen Kommensale verstanden werden, die potenziell nützlich für den Wirtsorganismus sind. Ob die pathogene Eigenschaft zu Tage tritt, hängt u. a. von der genetischen Disposition des Wirts und dem Mikromilieu in der Umgebung des Bakteriums ab. Unsere Modellkommensale *B. vulgatus* mpk (Symbiont) und *E. coli* mpk (Pathobiont) besitzen dabei schon eine grundlegend unterschiedliche Endotoxizität ihrer LPS-Struktur, die bei *E. coli* mpk deutlich höher ist als bei *B. vulgatus* mpk.

## **1.2 Angeborenes und adaptives Immunsystem: B-, T- und dendritische Zellen**

Das Immunsystem ist der Überbegriff für eine sehr heterogene Gruppe an einzelnen Zellen und löslichen Molekülen, die eine orchestrierte Immunantwort induzieren und durchführen. Primär richtet sich eine Immunantwort gegen pathogene Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilze. Aber auch beschädigte oder apoptotische Zellen des Wirtsorganismus können vom Immunsystem eliminiert werden. In erster Linie werden zwei Säulen des Immunsystems unterschieden, die allerdings ineinander übergehen und deren

Interaktion essenziell für eine ausreichende Immunkompetenz ist. Beide Säulen enthalten zelluläre und humorale Bestandteile.

Schon von Geburt an wird der Organismus vom angeborenen bzw. unspezifischen Immunsystem geschützt. Die zellulären Vertreter tragen mustererkennende Rezeptoren (PRRs = *pattern recognition receptors*), die durch sogenannte *microbe associated molecular patterns* (MAMPs), d.h. ausschließlich auf Mikroorganismen vorkommende Strukturmoleküle, gebunden und aktiviert werden können (Janeway and Medzhitov, 2002). Dadurch ist eine Unterscheidung von körpereigenen und körperfremd möglich. Der wichtigste Vertreter der PRRs ist der Toll-like-Rezeptor (TLR), von dem es bisher zehn humane und zwölf murine Untertypen gibt (teilweise übereinstimmend), die jeweils auf die Erkennung von spezifischen Strukturen spezialisiert sind (Akira et al., 2006). Zu den Zellen der angeborenen Abwehr zählen mononukleäre Phagozyten, Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Dazu kommen humorale Komplementfaktoren. Treffen diese Zellen während ihrer Zirkulation durch den Organismus auf MAMPs, leiten sie Abwehrmechanismen wie Phagozytose und die Sekretion von Effektormolekülen (z. B. Histamin) ein und induzieren eine Entzündungsreaktion. Chemokine führen weitere Immunzellen zum Ort des Geschehens. Außerdem präsentieren professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ) Bestandteile der Antigenstruktur für die naiven Zellen der zweiten Säule des Immunsystems: die erworbene (auch adaptive oder spezifische) Abwehr (Medzhitov, 2001). Diese muss durch Botenstoffe und direkten Zell-Zell-Kontakt vom angeborenen Immunsystem aktiviert werden. Da die Spezialisierung der adaptiven Immunabwehr auf jedes neue antigene Epitop einige Tage Zeit braucht, erfolgt die spezifische Immunabwehr erst in einer zeitversetzten zweiten Welle.

Als ein wichtiger Vertreter der professionellen APZ existiert die Population der dendritischen Zellen (DZ), die von Ralph Steinman 1973 erstmalig beschrieben wurden (Steinman and Cohn, 1973, Mellman, 2013). Diese Zellen dienen nicht in erster Linie der Bekämpfung von Pathogenen, sondern der Aufnahme pathogener Bestandteile, Migration in die lymphatischen Gewebe und dortige Aktivierung der klonalen Selektion von Lymphozyten für ganz bestimmte

Epitope (Kelsall, 2008). DZ existieren in verschiedenen Subtypen mit unterschiedlichem Maturationsgrad (immatur, semi-matur und matur). Der Maturationsgrad wird über die Expression co-stimulatorischer Moleküle wie MHC II, CD40, CD80 und CD86 und über die Sekretion einiger Zytokine (Frick et al., 2010) definiert. Welchen Reifungszustand die DZ erlangen, hängt auch mit der Art der Stimulation, bspw. durch Bakterien, zusammen, weshalb diese einen indirekten Einfluss auf die weitere Immunantwort hat. So zeigten Frick et al. (2006), dass *E. coli* mpk zur vollen Maturation führt, *B. vulgatus* mpk aber nur zum semi-maturen Zustand, der tolerogene Effekte ausübt. Im maturen Zustand werden die co-stimulatorischen Oberflächenmoleküle stark exprimiert und zusätzlich große Mengen der Zytokine Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-4 (IL-4) und andere sezerniert. TNF- $\alpha$  ist ein überwiegend pro-inflammatorischer Botenstoff, der wie Menges et al. (2002) zeigten, je nach Dosis zur Entwicklung pro-inflammatorischer voll maturer DZ oder zu modulatorisch wirksamen semi-maturen DZ führen kann. Mature DZ produzieren wiederum selbst viel TNF- $\alpha$ , was zu einer erhöhten Aktivierung von T-Helferzellen Typ 1 und 2 beitragen kann und so eine Immunantwort induziert. TNF- $\alpha$  wird von den unterschiedlichsten Zelltypen produziert und bewirkt laut Akdis et al. (2016) die Induktion einer starken Immunantwort, bevor TNF- $\alpha$  selbst die Entzündungsreaktion auch wieder limitieren kann.

Zum spezifischen Immunsystem zählen B-Zellen und T-Zellen, die mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Subtypen verschiedenste Aufgaben übernehmen und hochspezialisiert gegen das Antigen vorgehen. Beide Zelltypen können Effektor- und Gedächtniszellen bilden (Hamann et al., 1997, Sallusto et al., 1999, Dogan et al., 2009).

T-Zellen werden aufgrund ihrer *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Erkennung in MHC-I-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen und MHC-II-restringierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen eingeteilt. Erstere sind direkt zytotoxisch und führen über Apoptoseliganden (z. B. FasL) zum kontrollierten Absterben körpereigener Zellen, die Peptide über MHC-I präsentieren. Zur Präsentation über MHC-I ist nahezu jede Körperzelle befähigt, allerdings können nur professionelle

antigenpräsentierende Zellen Antigene über MHC-II präsentieren und damit den T-Zell-Rezeptor (TZR)/CD3-Komplex der T-Zellen aktivieren. Zu dieser Gruppe gehören dendritische Zellen, Monozyten und B-Zellen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen fungieren als Effektor- und Helferzellen, die über Zytokinsekretion pro- oder anti-inflammatorischer Botenstoffe andere Immunzellen mobilisieren oder unterdrücken. Damit stehen sie an einer Schlüsselposition der Immunhomöostase.

Unter den T-Helferzellen (Th) gibt es Th1-Zellen (CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>), denen über IL-2 und IFN- $\gamma$  besonders die Aktivierung der zellulären Immunität nachgewiesen wurde, und Th2-Zellen (CD4<sup>+</sup> IL4<sup>+</sup>), die mittels IL-4, -5, -10 und -13 humorale Abwehrreaktionen von B-Zell-Antikörpern gegen Helminthen hervorrufen (vgl. Moss et al., 2004, Nutman, 2015). Außerdem gibt es T-Helferzellen Typ 17 (CD4<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup> IL-4<sup>-</sup> IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>), die über pro-inflammatorische Zytokine effektiv extrazelluläre Erreger bekämpfen und daher auch in Zusammenhang mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen stehen (Tesmer et al., 2008).

Regulatorische Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen (T<sub>reg</sub>) bilden zu alledem ein Gegengewicht, indem sie v. a. durch Interleukin-10- und *Tumorgrowthfactor*- $\beta$ -(TGF- $\beta$ )-Produktion modulatorisch wirken und überschießende Immunreaktionen eindämmen.

Neben der Regulation der Immunreaktion durch T-Zellen spielen auch B-Zellen eine wichtige Rolle. Naïve B-Zellen müssen nicht zwingend wie T-Zellen von anderen APZ aktiviert werden, sondern können auch selbst über TLR und membranständige Antikörper Antigene erkennen. Nach diesem Kontakt können sie zu Plasmazellen differenzieren und unterschiedliche Klassen an Epitopspezifischen Antikörpern produzieren. Daher befinden B-Zellen sich an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität. Bei den pro-inflammatorischen B-Zellen werden B-Effektor-Typ 1 (B1) und Typ 2 (B2) unterschieden (Luu et al., 2014). B1-Zellen induzieren über IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 und Lymphotoxin- $\alpha$  die Polarisation von Th1-Zellen, wohingegen B2-Zellen über IL-4, IL-6 und z. T. IL-10 Th2-Zellen fördern.

Je nach Stimulus und Einfluss anderer Immunzellen ist auch die Entwicklung zu regulatorischen B-Zellen ( $B_{\text{regs}}$ , typischerweise  $IL-10^+$ ) möglich, die anhand ihrer Oberflächenmarker noch in zahlreiche Subtypen eingeteilt werden (vgl. Rosser and Mauri, 2015, van de Veen et al., 2016), wobei die meisten bisher nur für Mäuse bestätigt sind. Am bekanntesten sind die B10-Zellen ( $CD5^+ CD1d^+$ ), die über ihre IL-10-Sekretion  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Effektor-T-Zellen sowie DZ inhibieren (Yanaba et al., 2008). Mit einem etwas anderen Oberflächenmuster wurden diese IL-10-produzierenden B10-Zellen auch im Menschen gefunden (Iwata et al., 2011). Dass diese Population auch die Progression von Autoimmunerkrankungen im Mausmodell verhindern kann, haben Matsushita et al. (2008) und Fillatreau et al. (2002) bereits gezeigt. B10-Zellen sind ebenso wie weitere  $B_{\text{reg}}$ -Typen, namentlich *transitional 2 marginal-zone precursor cells* (T2-MZP;  $CD19^+ CD21^+ CD23^+ CD24^+$ ) und Tim-1<sup>+</sup> B-Zellen, in der Milz von Mäusen zu finden, von wo aus ihre modulatorische Tätigkeit startet (vgl. Evans et al., 2007, Ding et al., 2011). Weitere Populationen, die zum Kreis der murinen  $B_{\text{regs}}$  gezählt werden, sind bestimmte Typen von Plasmablasten ( $CD138^+ CD44^+$ ), Plasmazellen ( $CD138^+ MHC-11^{\text{lo}} B220^+$ ) und Marginalzonen-B-Zellen (MZ), deren Phänotyp allerdings nicht einheitlich beschrieben wird (vgl. Rosser and Mauri, 2015, van de Veen et al., 2016).

Alle bisher aufgezählten regulatorischen B-Zellen sind zur Produktion von IL-10 befähigt, welches durch die Limitation von Immunreaktionen als das wichtigste anti-inflammatorische Zytokin gilt (Couper et al., 2008). Weitere von regulatorischen B-Zellen produzierte, suppressiv wirkende Zytokine sind TGF- $\beta$  (Luu et al., 2014) und IL-35. TGF- $\beta$  ist ein 25 kDa schweres homodimeres Molekül, das außer von einer Vielzahl von Immunzellen auch von Epithelzellen und Fibroblasten gebildet wird. Die anti-inflammatorische Wirkung liegt in der Hemmung des Wachstums und der Differenzierung der meisten Vorstufen von Immunzellen. Alleine  $T_{\text{regs}}$  werden von TGF- $\beta$  gefördert (Akdis et al., 2016). Interleukin-35 – ein Heterodimer aus p35 und Ebi3 – wird von  $T_{\text{regs}}$  und  $B_{\text{regs}}$  produziert und induziert weitere regulatorische T-Zellen und eine IL-10-Sekretion (vgl. Akdis et al., 2016, Rosser and Mauri, 2015).

Zur Entstehung von B<sub>regs</sub> besteht noch Unklarheit, da es für B<sub>regs</sub> keinen eindeutig identifizierenden Marker wie bspw. Foxp3 für T<sub>regs</sub> gibt. Allerdings vermuten Rosser and Mauri (2015), dass aus unterschiedlichsten Entwicklungsstufen der B-Zellen B<sub>regs</sub> entstehen können. Außerdem postuliert die Forschungsgruppe um E. Rosser und C. Mauri, dass die B<sub>reg</sub>-Induktion reaktiv erfolgt und mit dem Ausmaß der Entzündung korreliert.

Dass B-Zellen mit direkter Antigen-Erkennung und professioneller Präsentation, sowie Antikörperproduktion und Zytokinsekretion so vielfältige Funktionen ausüben können und dabei sowohl Einfluss auf die angeborene als auch die erworbene Immunität nehmen können, macht sie für unsere Forschung besonders interessant – auch in Hinblick auf die Interaktion mit dem Mikrobiom.

### **1.3 Klinische Bedeutung bei Autoimmunerkrankungen**

Die Funktion des Immunsystems gleicht einer Gratwanderung zwischen Aggressivität und Toleranz: aggressives Vorgehen gegen eine Infektion durch Pathogene auf der einen Seite und Toleranz gegenüber harmlosen Reizen sowie die gezielte Beendigung der Immunantwort nach Elimination des Pathogens auf der anderen Seite. Gelingt dies unzureichend, leidet der Organismus entweder unter einer erhöhten Infektanfälligkeit durch ein schwaches Immunsystem oder er hat mit den Folgen einer gegen eigene Strukturen gerichteten, also *autoimmunen*, Entzündungsreaktion zu kämpfen.

Die Inzidenz und Prävalenz von entzündlichen Darmerkrankungen (hier als ein Beispiel für Autoimmunerkrankungen) korreliert mit dem sozioökonomischen Entwicklungsstatus des Landes. In Nordamerika und den meisten europäischen Ländern hat sich die Prävalenz bei ca. 0,3 % stabilisiert (Ng et al., 2017). Dagegen verzeichnen Nationen, die sich erst in den letzten Jahrzehnten zu einem westlichen, industrialisierten Lebensstil hin entwickelt haben, steigende Inzidenzen. Insgesamt spielt das Thema Autoimmunität und dessen Bekämpfung folglich eine zunehmende gesellschaftliche und ökonomische Rolle im Gesundheitssystem vieler Länder.

Autoimmunerkrankungen und Allergien entstehen meist durch eine multifaktoriell bedingte Überaktivierung des Immunsystems, das sich schließlich

gegen den eigenen Körper richtet. Zu den auslösenden Faktoren gehören genetische Prädisposition und Umweltfaktoren, wie Infektionen und Medikamente oder toxische Substanzen (Davidson and Diamond, 2001).

In den letzten Jahren wurden einige Autoimmunerkrankungen aus unterschiedlichsten Körperregionen in Verbindung mit einem veränderten Mikrobiom, insbesondere des Darms, gebracht. Darunter finden sich der Systemische Lupus Erythematoses (Zhang et al., 2014), die Psoriasisarthritis (Scher et al., 2015), der Typ-1-Diabetes (Maffeis et al., 2016) und die Multiple Sklerose (Cantarel et al., 2015, Berer et al., 2017).

Die grundlegende Erforschung des Zusammenhangs zwischen dem Mikrobiom, von dem man lange dachte, dass es sich um einen lokal abgekapselten Mikrokosmos handelt, und dem im gesamten Organismus agierenden Immunsystem ist von enormer Bedeutung. Allein die Tatsache, dass kommensale Bakterien die Grundlage für mindestens 20 % der Blutmetabolite darstellen, zeigt, wie weit der Einfluss des intestinalen Mikrobioms reicht (vgl. Opazo et al., 2018, Rook et al., 2017). Erstmals publizierten Mazmanian et al. (2005), dass ein von symbiontischen Darmbakterien produziertes Molekül immunmodulatorische Eigenschaften aufweist: Polysaccharid A, welches von *Bacteroides fragilis* produziert wird, zeigte dabei über die Induktion von IL-10 protektive Eigenschaften und schützte in Tierversuchen vor entzündlichen Darmerkrankungen (vgl. Mazmanian et al., 2008, Round and Mazmanian, 2009).

Der direkte Kontakt zwischen Mikrobiom und Immunsystem findet über drei verschiedene lymphatische Gewebe und die dem Epithel aufliegende Mukusschicht statt (vgl. Opazo et al., 2018, Richards et al., 2016, Shi et al., 2017). Intraepithelial befinden sich (T-) Zellen (Wang et al., 2002) und dendritische Zellen, die sogar in der Lage sind, die Tight junctions zwischen dem Darmepithel zu öffnen, um Antigene aus dem Darmlumen aufzunehmen (vgl. Rescigno et al., 2001, Kelsall, 2008). Direkt dahinter befindet sich die Lamina propria mit B- und T-Zellen, für deren Entwicklung unter anderem auch das Darmmikrobiom Stimuli bietet (Lui et al., 2015).

In den Peyer-Plaques im Dünndarm, die eine Anhäufung von Lymphfollikeln gegenüber dem Mesenteriumsansatz darstellen, befinden sich Immunglobulin-A-produzierende B- und Plasmazellen, die T-Zell-abhängig und T-Zell-unabhängig agieren können (Bemark et al., 2012). Dass B-Zellen so vielfältige Aufgaben in einem Zelltyp vereinen, wie Antigenerkennung und Antigenpräsentation, Zytokinsekretion und Antikörperproduktion, und dabei sehr autark funktionieren, macht sie für die Forschung im Zusammenhang mit Autoimmunität so interessant. Darüber hinaus exprimieren sie Toll-like-Rezeptoren, bei denen genetische Polymorphismen oft mit einer erhöhten Anfälligkeit für entzündliche Darmerkrankungen vergesellschaftet sind (vgl. Franke et al., 2010, Haag and Siegmund, 2015). Wie Rakoff-Nahoum et al. (2004) zeigen konnten, ist die Interaktion der TLRs mit der Darmflora essenziell zur Erhaltung der intestinalen Homöostase.

Zur Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung trägt maßgeblich ein Wechselspiel autoreaktiver T-Zellen mit B-Zellen bei, die entweder Autoantigene präsentieren, Autoantikörper produzieren oder im Gegenteil, die T-Zell-Reaktion hemmen. Schon vor vielen Jahren konnten Wolf et al. (1996) an B-Zell-defizienten Mäusen zeigen, dass B-Zellen wohl weniger eine Rolle beim Beginn der experimentellen Autoimmunenzephalitis (EAE) spielen, als vielmehr zu deren Abklingen beitragen. Fillatreau et al. (2002) führten die Unterdrückung der durch Th1-Zellen vorangetriebenen EAE schließlich auf IL-10-produzierende B-Zellen zurück. Goetz et al. (2007) sowie Dass et al. (2007) wurden vor einigen Jahren im klinischen Setting auf die Relevanz anti-inflammatorischer B-Zell-Subtypen aufmerksam, als ihre Patienten nach einer Rituximab-Therapie, die über CD20 nahezu alle B-Zellen depletiert, Exazerbationen einer Colitis oder eine Psoriasis entwickelten. Auch beim Multiple-Sklerose (MS) -Patienten wurde bereits mehrfach gezeigt, dass eine überschießende T-Zell-Reaktion mit einer mangelnden modulatorischen Fähigkeit von B-Zellen assoziiert ist. Insbesondere die IL-10-Spiegel stellten sich bei MS-Patienten in der aktiven Krankheitsphase als erniedrigt gegenüber der Remissionsphase oder gegenüber gesunden Probanden dar (vgl. Knippenberg et al., 2011, Duddy et al., 2007, Hirotsani et al., 2010).

Auch in Betracht zu ziehen für die Ursache von Autoimmunerkrankungen, ist eine gestörte Responsivität anderer Immunzellen auf B<sub>regs</sub>, wie sie schon für T<sub>regs</sub> bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen wurde (Fantini et al., 2009).

Daher ist es für die Erkennung und Therapie von Autoimmunerkrankungen essenziell, die Mechanismen hinter der gestörten Immunhomöostase zu verstehen. Mit dieser Arbeit wollen wir uns schwerpunktmäßig mit den Einflüssen regulatorischer B-Zellen auf andere Immunzellen wie T-Zellen und dendritische Zellen befassen. Zudem soll über den Vergleich der Effekte von *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk die Rolle der Symbionten und Pathobionten in der Toleranzentwicklung untersucht werden.

Zusätzlich ist das Wissen um Mechanismen der Immunmodulation auch in anderen klinischen Bereichen anwendbar. Auch Pathogene, wie der für viele Magenentzündungen verantwortliche Keim *Helicobacter pylori*, machen sich diese IL-10-basierte Methoden zu Nutze, um eine Immunevasion zu bewirken (Rizzuti et al., 2015). Zudem erzeugen Tumore ein anti-inflammatorisches Mikromilieu über B<sub>regs</sub> und T<sub>regs</sub>, das ihnen ein vom Immunsystem unbehelligtes Wachstum und Verbreitung ermöglicht (Olkhanud et al., 2011).

Eine neue Therapieoption für Autoimmunkrankheiten könnte daher möglicherweise die Unterstützung bzw. Wiederherstellung der T<sub>reg</sub>-Funktion durch die Übertragung gesunder B-Zellen oder sogar B<sub>regs</sub> in den kranken Organismus sein. Diese Methode war bereits in Tierversuchen von Sun et al. (2008) und Carter et al. (2011) erfolgreich.

## 1.4 Zielsetzung

Autoimmunerkrankungen steigen weltweit gesehen in ihrer Prävalenz und betreffen vor allem junge Leute, die ein Leben lang damit zu kämpfen haben. In zahlreichen Studien wurde bereits ein Zusammenhang gestörter Immunhomöostase mit dem Defekt regulatorischer B-Zellen und ihres Effektorzytokins IL-10 nachgewiesen. Andere Studien suchen die Ursache autoimmuner Erkrankungen im Darmmikrobiom, wo tatsächlich charakteristische Veränderungen bei vielen dieser Erkrankten zu finden waren. Folgende Frage stellt sich: Sind dies zwei völlig unabhängige Befunde oder sind dagegen beide Teile eines großen Systems wechselseitiger Interaktionen? Einige Aspekte dieser Frage soll die vorliegende Arbeit zu den immunmodulatorischen Effekten ausgewählter Kommensale beantworten.

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Darmbakterien, und vor allem Pathogene, ihre immunstimulatorischen Effekte über B-Zellen vermitteln. Eine systematische Untersuchung der Wirkungen von Symbionten und Pathobionten liegt bis dato aber noch nicht vor und auch die weiteren Auswirkungen auf andere Immunzellen wurden in dieser Form noch nicht ausreichend erforscht.

Wir vermuten, dass Pathobionten ihre pro-inflammatorischen Effekte mit einer gleichzeitig stärkeren Induktion der anti-inflammatorischen Eigenschaften von B<sub>regs</sub> gegenregulieren. Nur durch die Nutzung dieser B-Zell vermittelten Mechanismen ist es ihnen trotz ihrer starken immunogenen Wirkung möglich, vom Wirt toleriert zu werden und damit als fakultative Pathogene zu wirken.

In Co-Kulturen verschiedener Immunzellkombinationen sollen nach Stimulation mit *E. coli* mpk (Pathobiont) und *B. vulgatus* mpk (Symbiont) die Interaktionen der Zellen beobachtet werden. Anhand typischer Oberflächenmarker und Zytokine sollen Zellpopulationen auf einzelne Phänotypen und Proliferation untersucht werden.

Mit unserer Forschung wollen wir das Verständnis für das Gleichgewicht aus Aktivierung und Gegenregulation der Immunreaktion fördern, sowie ein Bewusstsein für die Effekte des Mikrobioms und dessen genauer Zusammensetzung für den Aktivitätszustand des Immunsystems schaffen.

Langfristig sollen diese Erkenntnisse zur Diagnostik, Prophylaxe und Therapie bei Autoimmunerkrankungen beitragen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Name	Hersteller, Typ
Anaerobiertopf	MERCK, Anaerocult
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg Nr. 6131 04987
Brutschrank	Heraeus, Heidelberg
ELISA Washer	TECAN M8/4R Columbus Plus F109204
ELISA-Reader	TECAN infinite F50
FACS-Analysator	BD LSRFortessa™ Cell Analyzer, Kat.-Nr. 649225 Laser: violett (405 nm), blau (488 nm), rot (640 nm)
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss LSM 710
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Preciss, Frankreich
Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg Research plus
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Schüttelinkubator 37°C	Multitron, INFORS, Bottmingen
Sterile Arbeitsbank (Bench)	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Vortexer	Multimed, Kirchheim u. Teck Heidolph Reax top
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge 517 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge miniSpin plus	Eppendorf, Hamburg
Färbewanne	Simport

### 2.1.2 Verbrauchsgegenstände

*Tabelle 2: Verbrauchsgegenstände*

Name	Hersteller
Anaerobier-Beutel	Thermo Scientific AnaeroGen™ 2,5 l
Küvetten	Sarstedt, Nürnberg 10 x 4 x 45 mm
Mikrotiterplatten (96-Well-Platten: Flachboden, Rundboden, Spitzboden)	Thermo Scientific, Roskilde Dänemark
Nunc MaxiSorb-ELISA-Platten	Nunc, Roskilde, Dänemark?
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spitzboden-Röhrchen 15 ml	BD Bioscience Falcon, Heidelberg
Spitzbodenröhrchen 50 ml	BD Bioscience Falcon, Heidelberg
Spritzen 10 ml	Braun, Melsungen Injekt 10 ml Luer Solo
Transwell-Platten 0,4 µm Polyester Membrane	Corning Incorporated, USA COSTAR® Transwell, Kat.-Nr. 3460 - Clear
Zellfilter 70 µm / 100 µm	BD Bioscience Falcon, Heidelberg Cell Strainer 70 µm / 100 µm Nylon
Zellkulturplatten (6-Well)	BD Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten (24-Well)	Greiner bio-one Cellstar® Kat.-Nr. 662 160
Zellschaber	Corning Incorporated, Mexiko COSTAR® Cell Lifter Polythylene, steril 3008

### 2.1.3 Mäuse

Tabelle 3: Mäuse

Name	Hersteller
C57BL/6NCrl	Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA
TLR2xTLR4 KO GVO	Eigenzucht des Mikrobiologischen Instituts Tübingen
OT-II / BL6	Eigenzucht des Mikrobiologischen Instituts Tübingen C57BL/6-Tg(TcraTcrb)425Cbn/Crl

### 2.1.4 Bakterien

Tabelle 4: Bakterien

Name	Hersteller
<i>Bacteroides vulgatus</i> mpk	Isoliert aus Fäzes von gesunden SPF Mäuse des Max-von-Pettenkofer-Institute Munich
<i>Escherichia coli</i> mpk	Isoliert aus Fäzes von gesunden SPF Mäuse des Max-von-Pettenkofer-Institute Munich

### 2.1.5 Medien und Puffer

Tabelle 5: Medien und Puffer

Name	Hersteller
(D)PBS+ Mg/Ca	GIBCO by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA, Kat.-Nr. 14040091
BHI-Medium	Oxoid CM1136 12,5 g/l Brain infusion solids 5 g/l Beef heart infusion solids 10 g/l Proteose peptone 5 g/l Sodium Chloride 2 g/l Glucose 2,5 g/l Disodium-Phosphate

	10 g/l Agar
DZ-Medium	In eine 500 ml-Flasche RPMI 1640: 50 ml hitzeinaktiviertes FCS 5 ml Nea 20 ml GM-CSF 2,5 ml $\beta$ -Mercaptoethanol (0,78 %ig mit PBS) 5,5 ml P/S
Erythrozyten-Lysepuffer	4,15 g $\text{NH}_4\text{Cl}$ 0,5 g $\text{NaHCO}_3$ 1,85 g $\text{Na}_2\text{EDTA}$ $\text{H}_2\text{O}$ 500 ml
HEPES	Biochrom (MERCK), Kat.-Nr. L1613
LB-Medium	BD Bioscience, Heidelberg Difco™ LB Broth Miller, 224610 10 g Tryptone 5 g Yeast Extract 10 g Sodium Chloride Davon 25 g in 1 l VE-Wasser auflösen
Lymphozyten-Medium (B-/T-Zell-Medium)	78 % RPMI 1640 10 % FCS 2,5 % Hepes 5 % Penicillin/Streptomycin 2,5 % $\beta$ -Mercaptoethanol 1 % non-essential amino acids 1 % Sodumpyruvate
PBS ohne Mg/Ca	GIBCO by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA, Kat.-Nr. 20012-019
PBS-Pulver	Biochrom (MERCK), 1 Packung für 10 Liter
Perm/Wash-Reagenz	85 % PBS 10 % Saponin 5 % FCS
RPMI 1640	Biochrom (MERCK) Kat.-Nr. F 1415

## 2.1.6 Durchflusszytometrie: Antikörper

Tabelle 6: Durchflusszytometrie: Antikörper

Reaktivität	Antigen	Fluorophor	Host	Klon	Kat.-Nr.	Hersteller
Maus	CD11c	APZ	Hamster	HL3	550261	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	CD19	Bv421 (Pacific Blue)	Ratte	1D3	562701	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	CD1d	Alexa Fluor 647	Ratte	1B1	564706	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	CD21 / CD35	Bv605 (Qdot)	Ratte	7G6	563176	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	CD23	BB515 (FITC)	Ratte	B3B4	564637	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	CD24	Alexa Fluor 700	Ratte	M1/69	564237	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	CD365 (TIM-1)	PE	Ratte	RMT1- 4	566335	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	CD4	Bv421 (Pacific Blue)	Ratte	GK-1.5	562891	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	CD4	APZ	Ratte	RM4-5	553051	BD Bioscience, Heidelberg

Maus	CD40	APZ	Ratte	3/23	558695	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	CD40	Bv421	Ratte	3/23	562846	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	CD45R / B220	FITC	Ratte	RA3- 6B5	553087	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	CD5	Bv605 (Qdot)	Ratte	53-7.3	563194	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	CD80	PerCP-Cy 5.5	Hamster	16- 10A1	560526	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	CD86	PE-Cy 7	Hamster	GL1	560582	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	Foxp3	Alexa Fluor 647	Ratte	MF23	560402	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	I-A/I-E (MHC II)	FITC	Ratte	2G9	553623	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	IFN- $\gamma$	PE-Cy7	Ratte	XMG1	557649	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	IgM	APZ	Ratte	II/41	562032	BD Bioscience, Heidelberg

Maus	IL-10	PE	Ratte	JES5-16E3	554467	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	IL-17A	APZ-Cy7	Ratte	TC11-18H10	560821	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	IL-4	PE	Ratte	11B11	554434	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	V $\beta$ 5.1, 5.2	Bv605 (Qdot)	Maus	MR9-4	743000	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	Tim-1 (CD365)	PE	Ratte	RMT1-4	566335	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	Fas-L (CD178)	PE	Hamster	MFL3	555293	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	GITR-L	PE	Ratte	MIH44	563541	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	PD1-L (CD274)	PE	Ratte	MIH5	558091	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	CD73	PE	Ratte	TY/23	550741	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	IL-10-R (CD210)	PE	Ratte	1B1.3a	559914	BD Bioscience, Heidelberg
Maus	<i>Ebi3</i>	PE	Ratte	35502 2	IC18341 P	R&D

### 2.1.7 Antikörper zur Fluoreszenzmikroskopie

Tabelle 7: Antikörper zur Fluoreszenzmikroskopie

Reaktivität	Antigen	Kopplung	Host	Klon	Kat.-Nr.	Hersteller
Maus	CD19	Primär-Antikörper	Ratte	eBio1D3 (1D3)	14-0193-82	eBioscience
Maus	CD11c	Primär-Antikörper	Hamster	Integrin $\alpha$ chain	117302	BioLegend
Ratte	IgG (H+L)	Cy2	Ziege	Polyklonal	112-225-167	Jackson Immuno-research
Armenischer Hamster	IgG (H+L)	DyLight 594	Ziege	Poly 4055	405504	BioLegend

### 2.1.8 Chemikalien zur B-Zell-Isolation

Tabelle 8: Chemikalien zur B-Zell-Isolation

Name	Hersteller
B Cell Isolation Kit, mouse # 130-090-862	Miltenyi Biotec, Kat.-Nr. 130-090-862 <b>1 ml Biotin-Antibody Cocktail, mouse:</b> Cocktail of biotin-conjugated monoclonal antibodies against CD43 (Ly48) (Isotyp: rat IgG2a), CD4 (L3T4) (Isotyp: rat IgG2b), and Ter-119 (Isotyp: rat IgG2b) <b>2 ml anti-Biotin MicroBeads:</b> MicroBeads conjugated to monoclonal anti-biotin antibodies (isotype: mouse IgG1)
Naïve CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit, mouse # 130-104-453	<b>1 ml Naïve CD4<sup>+</sup> T Cell Biotin-Antibody Cocktail, mouse,</b> Kat.-Nr. 130-104-453: Cocktail of biotin-conjugated monoclonal antibodies against CD8a, CD11b, CD11c,

	<p>CD19, CD25, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, anti-MHC class II, Ter-119, and TCR<math>\gamma/\delta</math>.</p> <p><b>2 ml Anti-Biotin MicroBeads:</b> MicroBeads conjugated to monoclonal antibiotin antibodies (isotype: mouse IgG1).</p> <p><b>1 ml CD44 MicroBeads, mouse:</b> MicroBeads conjugated to monoclonal antimouse CD44 antibodies (isotype: rat IgG2b).</p>
Invitrogen UltraComp eBeads	Thermo Fisher Scientific
Leukocyte Activation Cocktail with BD GolgiPlug™	BD Bioscience Kat.-Nr. 550583

### 2.1.9 Antikörper, Puffer und Lösungen für ELISAs

Tabelle 9: Antikörper, Puffer und Lösungen für ELISAs

Name	Hersteller, Zusammensetzung
Assay Diluent (=Blockpuffer)	Eigenherstellung 500 ml PBS 50 ml FCS (hitzeinaktiviert)
BD OptEIA™ Mouse IL-1 $\beta$ ELISA Set	BD Bioscience, Heidelberg Kat.-Nr. 559603
BD OptEIA™ Mouse IL-6 ELISA Set	BD Bioscience, Heidelberg Kat.-Nr. 555240
BD OptEIA™ Mouse IL-10 ELISA Set	BD Bioscience, Heidelberg Kat.-Nr. 555252
BD OptEIA™ Mouse TNF- $\alpha$ ELISA Set	BD Bioscience, Heidelberg Kat.-Nr. 555268
Substratlösung	BD Bioscience, Heidelberg 5 ml Substanz 1 (weiße Flasche) 5 ml Substanz 2 (braune Flasche)

Stopplösung	Eigenherstellung 2n $\text{H}_2\text{SO}_4$
Waschpuffer	Eigenherstellung 10 l Ampuwa 1 Päckchen 10x PBS Pulver (Biochrom / MERCK) 5 ml Tween 20
Coating Buffer IL-10 0,2 Sodium Phosphate	Eigenherstellung 11,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (MERCK 177,99 g/mol) 16,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (MERCK 137,99 g/mol)
Coating Buffer IL-6 0,1m Sodium Carbonat	Eigenherstellung 7,13g $\text{NaHCO}_3$ + 1,59 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , auf 1 l auffüllen ; pH auf 9,5 einstellen mit 10 N NaOH

### 2.1.10 Sonstige Reagenzien

Tabelle 10: Sonstige Reagenzien

Name	Hersteller
Anti-mouse-IL-10 mAb	BioLegend, Kat.-Nr. 504902
$\beta$ -Mercaptoethanol	AppliChem, Kat.-Nr. A1108,0025
CFSE + DMSO	Invitrogen Thermo Fisher Scientific Cell Trace™ CFSE Cell Proliferation Kit For flow cytometry, Kat.-Nr. C34554
Cytofix/Cytoperm	BD Bioscience, Heidelberg
DAPI	MERCK Kat.-Nr. 1.24653
EDTA-Versen	Biochrom (MERCK)
Fc-Block	Eigenherstellung: Überstand aus Hybridoma 2.4G2-Zellkultur (Firma ATCC, HB-197) mit Zellkulturmedium: 500 ml RPMI 1640, 50 ml FCS, 5 ml Glutamin (1:100), 5 ml Penicillin/Streptomycin (1:100)

FCS (56°C hitzeinaktiviert)	GIBCO by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Fixable Viability Dye eFluor™ 780	eBioscience, Thermo Fisher Kat.-Nr. 65-0865-14
Gentamycinsulfat	AppliChem, A4854,0005
GM-CSF	Eigenherstellung
Non-essential amino acids	Biochrom (MERCK)
OVA-Peptid	EMC Microcollections GmbH, BAP-250, Ova (323-339), Aminosäuresequenz: ISQAVHAAHAEINEAGR
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Alderich (MERCK) Kat.-Nr. P6148
Penicillin/Streptomycin	GIBCO by Life Technologies Kat.-Nr. 15140-122
Phalloidin TRITC	Sigma-Alderich (MERCK) Kat.-Nr. P1951
Rekombinantes IL-10	BioLegend Kat.-Nr. 575804
Saponin (1 g auf 100 ml PBS)	Sigma-Alderich (MERCK) Kat.-Nr. S7900-100G
Sodumpyruvate	Biochrom (MERCK)
TritonX-100	MERCK, Kat.-Nr. 1086031000
Trypan Blue	Sigma-Alderich (MERCK), USA
Tween 20	Sigma-Alderich (MERCK), USA Kat.-Nr. P9416-100ML
Mowiol Mounting Medium	CALBIOCHEM, 4-88 Reagent Kat.-Nr. 475904

### 2.1.11 Software

Tabelle 11: Software

Anwendung	Name
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop CS6 (64 bit)
Durchflusszytometrie	FACSDiva™ Software
Datenauswertung Durchflusszytometrie	FlowJo V10
Diagramme / Statistik	Graphpad PRISM 7
ELISA-Auswertung	Magellan for 50
Grafiken	Inkscape
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	ZEN Software
Literaturverwaltung	EndNote X9
Tabellen und Berechnungen	Microsoft Excel 2010 / 2013
Texte	Microsoft Word 2010 / 2013

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchstiere

Im Rahmen der In-vitro-Experimente kamen C57BL/6NCrI-Mäuse (WT) sowie TLR2xTLR4-Knockout-Mäuse für die B-Zell-Isolation zum Einsatz. T-Zellen wurden aus OT-II-Mäusen gewonnen, die unter speziell pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten wurden. Diese Mauslinie entstammt der eigenen Zucht der Serviceeinrichtung für Transgene Tiere FORS/Hi in Tübingen. Die Mäuse wurden zu mehreren in Käfigen gehalten und erlitten zu Lebzeiten keine besondere Belastung. Getötet wurden sie in vertrauter Umgebung durch Kohlenstoffdioxidgas, das direkt in ihren Käfig geleitet wurde, um größeren Stress für die Tiere zu vermeiden. Anschließend erfolgte zur Sicherheit ein Genickbruch.

Alle Experimente mit Tierbeteiligung erfolgten nach Zustimmung der zuständigen Ethikkommission. Der Genehmigungsantrag trug das Zeichen H1/15 und die Anzeigenummern §4 09.01.2015 und §4 14.06.2017.

### 2.2.2 Bakterienkultur und Quantifizierung

Aufgrund der längeren Generationszeit wurde die *B. vulgatus* mpk-Kultur schon fünf bis sechs Tage vor dem eigentlichen Experimentbeginn in *Brain Heart Infusion* (BHI)-Medium angesetzt und unter anaeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Dafür wurden 50 µl aus dem tiefgekühlten *B. vulgatus* mpk-Stock in ein Reagenzglas mit BHI-Medium und einem Leberstück überführt. An Tag fünf bzw. sechs wurden jeweils 10 ml der Bakterienkultur in 40 ml frisches BHI-Medium überführt, um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten, und anschließend weitere 24 h anaerob bei 37°C kultiviert.

Von dem tiefgekühlten *E. coli* mpk-Stock wurden 50 µl in 5 ml LB-Medium (Luria Bertani) angeimpft und bei 37°C auf einem Schüttler einen Tag inkubiert. Drei Stunden vor Stimulation wurden von dieser Kultur 400 µl in 20 ml frisches Medium überimpft und weiter auf dem Schüttler inkubiert.

Zur Stimulationsvorbereitung wurden die beiden Bakterienkulturen jeweils in ein Falcon überführt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml sterilem PBS

resuspendiert. Zur Quantifizierung der Bakterienzellen wurde die photometrische Messung verwendet und die Extinktion einer 1:20-Verdünnung der beiden Bakteriensuspensionen gegen den Leerwert bestimmt. Dafür galt die aus Vorversuchen ermittelte Annahme, dass eine Extinktion von 1.0 bei einer OD<sub>600</sub> 5 x 10<sup>8</sup> Bakterien entspricht.

### **2.2.3 Zellkulturen**

#### 2.2.3.1 Allgemeine Zellzahlbestimmung

Die Zellsuspension wurde in einer 1:20-Verdünnung mit Trypanblau gefärbt. Nach Übertragung auf eine Neubauer-Zählkammer war eine Quantifizierung mittels Lichtmikroskop möglich. Dabei wurden alle Zellen innerhalb der Großquadrate gezählt.

Über folgende Formel konnte die Anzahl der Zellen pro Milliliter bestimmt werden, wobei der letzte Multiplikand den Volumenfaktor der Kammer darstellt:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 \text{ ml}^{-1}$$

#### 2.2.3.2 B-Zell-Isolation, -Kultur und -Stimulation

Es wurden murine B-Zellen von weiblichen, sechs bis acht Wochen alten Mäusen verwendet.

Zunächst wurden die Milzen der Mäuse vorsichtig herauspräpariert und in 10 ml einer sterilen Pufferlösung (PBS/0,5% FCS, ohne Magnesium, + 2 mM EDTA) erst durch ein grobes, später durch ein sehr feines Sieb (70 µm Porengröße) püriert. Durch dieses Verfahren können Fettreste entfernt werden, die sonst als Verklumpungskerne dienen könnten. Durch Zugabe von je 4 ml Erythrozytenlysepuffer zu den Zellpellets nach kurzer Zentrifugation (5 min, 400 x g, 4°C) wurden die Erythrozyten unter vorsichtigem Schwenken der Suspension lysiert. Es erfolgte eine erneute Filterung durch einen 70 µm-Filter mit zwei sich anschließenden Waschschritten (Zentrifugation bei 400 x g, 4°C und Resuspension in je 10 ml PBS/FCS).

Um alle Zelltypen außer den gewünschten naiven B-Zellen beim Prozess der Magnetischen Zell-Separation (MACS) aus den Proben zu entfernen, wurde ein B-Zell-Isolations-Kit den Herstellerangaben entsprechend angewendet. Die darin enthaltenen Antikörper richteten sich gegen CD43 (Ly48) (Isotyp: rat IgG2a), CD4 (L3T4) (Isotyp: rat IgG2b) und Ter-119 (Isotyp: rat IgG2b). Die Säulen wurden vor Verwendung mit 3 ml PBS/1% FCS und nach dem Zelldurchfluss erneut mit 2x 3 ml gespült. Die zu isolierenden B-Zellen konnten ungehindert durch die Magnetsäule fließen und aufgefangen werden (negative Selektion). Nach 5 min Zentrifugation bei 400 x g wurde jedes Zellpellet in je 3 ml Medium aufgenommen. Auch an diesem Punkt wurden die B-Zellen wieder mittels einer Neubauer-Zählkammer quantifiziert. Anschließend wurden je 2 Millionen Zellen pro Milliliter ausgesät.

Während der gesamten Zeit wurden die Zellen möglichst bei einer Temperatur von 4°C (Eisbox und Kühlschrank) gehalten, um Stoffwechselprozesse zu verlangsamen und so viele Zellen wie möglich am Leben zu erhalten.

Um die B-Zellen aus ihrem naiven Zustand heraus zu aktivieren, zur Differenzierung anzuregen und die Interaktion mit den anderen Zelltypen zu ermöglichen, wurden die Lymphozyten in drei Ansätzen stimuliert: Der erste Ansatz blieb unbehandelt und bildete die Negativkontrolle, der zweite wurde mit dem Symbionten *B. vulgatus* mpk inkubiert und der dritte Ansatz wurde mit dem Pathobionten *E. coli* mpk stimuliert. Die Bestimmung der Zellzahlen sowohl der Bakterien als auch der B-Zellen war relevant, um eine definierte *Multiplicity of infection* (MOI) von 1 zu erreichen. Dies bedeutet, dass Bakterien und B-Zellen in einem äquivalenten Verhältnis vorliegen.

Anschließend wirkte die Zugabe von 2 µl Gentamycin auf 1 ml Medium (zusätzlich zum schon vorhandenen Pen/Strep) gegen die schnelle Proliferation der Bakterien. Dies war wichtig, da sich vor allem bei *E. coli* mpk durch die kurze Generationszeit die MOI sehr schnell verändert hätte.

#### 2.2.3.3 Isolation, Kultur und Stimulation von KGDZs

Vorläuferzellen knochenmarksgereifter dendritischer Zellen (KGDZs) wurden aus dem Knochenmark der beiden Ober- und Unterschenkel von

Wildtypmäusen isoliert. Die Knochen wurden vorsichtig vom umliegenden Gewebe frei präpariert und dann nahe dem Hüftkopf und am Sprunggelenk vom restlichen Skelett abgetrennt und in eine Petrischale mit PBS/1% FCS gelegt.

Mittels eines Desinfektionsmittel-getränkten Tuches entfernte man Fett und Gewebereste. Knapp ober- und unterhalb der Kniegelenke wurden die Röhrenknochen durchgeschnitten. Eine mit PBS/1% FCS gefüllte 10 ml-Spritze mit aufgesetzter Kanüle konnte zum Ausspülen des Knochenmarks über ein 70 µm-Zellsieb auf einem Falcon genutzt werden. Der sterile Kolben der Spritze wurde zum vorsichtigen Durchpassieren der Zellen durch das Sieb verwendet.

Die Falcons mit der Zellsuspension wurden 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Zudem wurde ein DZ-Medium hergestellt (siehe Tabelle 2.1.5) und vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Die Zellpellets wurden in je 10 ml DZ-Medium resuspendiert und mit einer Neubauer-Zählkammer quantifiziert. In vorbereitete Petrischalen wurden jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen pro Schale ausgesät und mit 10 ml DZ-Medium versetzt. Die Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Nach zwei bis drei Tagen wurde jede Petrischale mit 10 ml frischem DZ-Medium versetzt.

Nach weiteren zwei bis drei Tagen wurden aus jeder Petrischale 10 ml DZ-Medium entnommen, in mehreren Falcons pro Maus gepoolt (Pool nur innerhalb einer Maus) und bei 400 x g 5 min lang zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und alle Pellets einer Maus wurden insgesamt 10 ml DZ-Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde wieder auf die entsprechenden Petrischalen verteilt und zusätzlich nochmals 10 ml frisches DZ-Medium pro Schale dazugegeben.

An Tag sieben nach der Isolation dendritischer Vorläuferzellen wurden die, durch den Wachstumsfaktor GM-CSF zu immaturren dendritischen Zellen differenzierten, Zellkulturen vorsichtig mit einem Plastikschaber vom Boden der Petrischalen gelöst und mitsamt dem Medium in 50 ml-Falcons überführt. Nach fünf Minuten Zentrifugation bei 400 x g wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet einer Maus in insgesamt 10 ml DZ-Medium ohne GM-CSF

resuspendiert, um verfälschende Auswirkungen des Wachstumsfaktors auf die Differenzierung anderer Zelltypen zu vermeiden. Je nach Versuch wurden die Zellen nun auf unterschiedliche Art und Weise ausgesät.

Analog der Stimulation von B-Zellen wurden auch die DZ mit einer MOI von 1 mit *E. coli* mpk stimuliert (siehe 2.2.3.2) und anschließend weiter im Brutschrank inkubiert.

#### 2.2.3.4 T-Zell-Isolation und –Kultur allgemein

Die Isolation von T-Zellen erfolgte analog zur B-Zell-Isolation (siehe 2.2.3.2). Allerdings wurde zur Negativselektion von naiven T-Zellen ein Kit mit Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD8a, CD11b, CD11c, CD19, CD25, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, Anti-MHC Klasse II, Ter-119, und TCR $\gamma/\delta$ . verwendet.

Die T-Zellen stammten aus OT-II-Mäusen, die genetisch so verändert sind, dass ihr T-Zell-Rezeptor ausschließlich OVA-Peptid auf den oberflächlichen MHC-II-Molekülen antigenpräsentierender Zellen binden kann. Dadurch hat der Experimentator die Sicherheit, dass nur diese Art der direkten Interaktion, z. B. zwischen B- und T-Zellen, die T-Zellen aktiviert. Außerdem liegt eine vierfach erhöhte Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen in diesen Mäusen vor.

#### 2.2.3.5 CFSE-Färbung der T-Zellen

Nach der zweiten Zellzählung (nach dem MACS) wurden die T-Zellen erneut 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet je nach Zellzahl in so viel PBS (+Mg) mit 5% FCS (Raumtemperatur) aufgenommen, dass in der Endsuspension  $2 \times 10^5$  T-Zellen pro 100  $\mu$ l vorlagen. An dieser Stelle wurden T-Zellen in ein steriles Eppendorfgefäß entnommen, um sie später als nicht-CFSE-gefärbte Kontrolle zu verwenden (Anzahl entsprechend der Kontrollenzahl).

Die restlichen Zellen wurden in ein 15 ml-Falcon überführt und 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in 1 ml PBS/1%FCS (Raumtemperatur) aufgenommen.

Ein Tube CFSE-Lyophilisat (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) wurde mit 18 µl DMSO (Dimethylsulfoxid) aufgelöst, sodass eine Endkonzentration von 5 mM vorlag. Pro 1000 µl PBS/5%FCS sollten 2-4 µl der 5 mM CFSE-Lösung zu der gepufferten Zellsuspension gemischt werden, um eine Arbeitslösung von 10-20 µM zu erhalten (Hersteller empfiehlt für  $10 \times 10^6$  Zellen/ml 5-10 µM CFSE).

In ein 15 ml-Falcon wurde daher zunächst ein 2 µl-Tropfen 5 mM-CFSE an die Wand gesetzt und anschließend mit 1000 µl der Zellsuspension (Konzentration (12-)  $18 \times 10^6$  Zellen/ml) abgespült und zügig resuspendiert. Nun erfolgte eine 10-minütige Inkubation des in Alufolie eingepackten Falcons bei 37°C im Brutschrank, wobei die Suspension durch Schwenken alle paar Minuten gemischt wurde.

Die Zugabe von 10 ml eiskaltem FCS stoppte schließlich die Reaktion. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 400 x g zentrifugiert und anschließend zwei Mal gewaschen: Absaugen des Überstands und Resuspension in 1 ml PBS/1%FCS; Entnahme von 10 µl zur Zellzählung; erneute Zentrifugation, Abnehmen des Überstands und abschließende Resuspension in dem errechneten Volumen Lymphozytenmedium. Das Volumen wurde mit der gezählten Zellzahl so berechnet, dass eine Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen pro 100 µl erreicht wurde.

Auch die nicht-CFSE-markierten Zellen wurden in ein 15 ml-Falcon übertragen, zentrifugiert und in Lymphozytenmedium aufgenommen (berechnet aus der schon zuvor bekannten Zellzahl).

Nun wurden je 100 µl der Zellsuspension mit bzw. ohne CFSE entsprechend des zuvor festgelegten Layouts in die Vertiefungen der 96-Well-Platten gegeben.

#### 2.2.3.6 B-Zell-Charakterisierungen nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk

Naïve B-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben isoliert und stimuliert. Bei diesem Experiment wurde eine Zeitreihe gemessen, die die

Zeitpunkte 0 h, 24 h, 48 h und 72 h für vier biologische Replikate umfasste. Für jeden Zeitpunkt wurden separate 6-Well-Platten mit je  $1 \times 10^6$  B-Zellen/ml angelegt.

Vier bis sechs Stunden vor der Färbung wurden alle Zellen des B-Zell-Charakterisierungsversuchs mit einem Leukozyten-Aktivierungs-Cocktail (LAC) versetzt, der mittels Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) und Ionomycin die Zytokinproduktion abhängig vom individuellen Aktivierungszustand anregte. Gleichzeitig unterband ein Golgi-Stopp mithilfe von Brefeldin A die Ausschleusung der intrazellulär in Vesikeln gespeicherten Stoffe. Dadurch erhöhte sich die Konzentration der Botenstoffe im rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) der Zellen, was zu einer verbesserten Nachweisbarkeit in der Durchflusszytometrie führte.

#### 2.2.3.7 KGDZ- /B-Zell-Co-Kultur in Transwells

Zunächst wurden frisch isolierte naive B-Zellen zu je  $5 \times 10^6$  in die obere Kammer der Transwells bzw. in normale 12-Well-Platten gegeben (Zellzahl  $2,5 \times 10^6$  B-Zellen/ml) und stimuliert (vgl. Abbildung 1).

Nach 24 h Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurden differenzierte immature dendritische Zellen zu je  $1 \times 10^6$  DZ in die unteren Kammern der Transwells bzw. in die normalen 12-Well-Platten ausgesät (entspricht  $5 \times 10^5$  DZ/ml). Mit der Methode der Transwell-Co-Kultur sollten Effekte von direkter und indirekter Zellinteraktion zwischen B-Zellen und dendritischen Zellen untersucht werden. Die Transwells bestanden aus einer oberen Kammer (Volumen 0,5 ml), die in eine größere untere Kammer (Volumen 1,5 ml) eingesetzt war. Getrennt wurden die Kammern durch eine Membran mit  $0,4 \mu\text{m}$  Porengröße, die einen direkten Zellkontakt verhinderte. Eine Stunde vor Zugabe der DZ zu den B-Zellen wurde ein Teil der B-Zell-Ansätze mit Anti-IL-10-mAb der Konzentration  $10 \mu\text{g/ml}$  inkubiert. Anschließend wurden  $100 \text{ ng/ml}$  rekombinantes IL-10 in Kontrollansätze pipettiert. Die Co-Kultur wurde erneut für 48 h bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank inkubiert und anschließend fixiert.

#### 2.2.3.8 T-Zell-Proliferationsassay

Für die Co-Kultur des T-Zell-Proliferationsassays wurden die B-Zellen der vier Mäuse als biologische Replikate verwendet (da die T-Zellen gepoolt wurden) und schon einen Tag vor den T-Zellen isoliert, stimuliert und mit 10 µg/ml Ovalbuminpeptid (OVA) für zwei Stunden inkubiert. Dabei wurden verschiedene Zellverhältnisse von B- zu T-Zellen angelegt und durch die vorgelegte B-Zellzahl bestimmt: 10:1 ( $10 \times 10^6/\text{ml}$ ), 5:1 ( $5 \times 10^6/\text{ml}$ ) und 1:1 ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ). Vor Zugabe von  $1 \times 10^6$  T-Zellen/ml wurde die bisherige Zellkultur zentrifugiert und der Überstand mit dem gelösten OVA entfernt. Außerdem wurden in einen *E. coli* mpk-Ansatz der B-Zellen noch 10 µg/ml Anti-IL-10-Antikörper gegeben. Nach 72 h Inkubation bei 37°C wurde die Co-Kultur fixiert und gefärbt (siehe Abbildung 1).

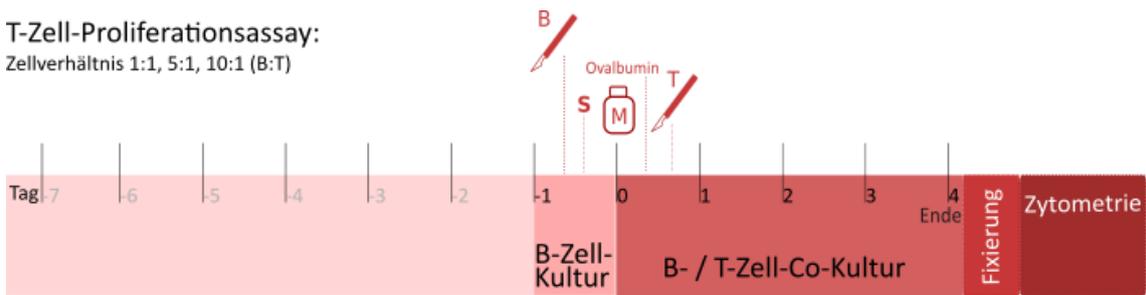
#### 2.2.3.9 Dreifachkultur

Für die Dreifachkultur wurden die dendritischen Zellen zu je  $1 \times 10^5$  in 96-Wells pipettiert ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) und teilweise in Co-Kultur mit der fünffachen Anzahl an 24 h bakteriell vorbehandelten B-Zellen ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) gebracht (siehe Abbildung 1). Anschließend erfolgte die Stimulation (siehe 2.2.3.2). Hier waren die dendritischen Zellen die biologischen Replikate und sowohl deren Mono- also auch Co-Kultur mit B-Zellen wurde, wie in Abschnitt 2.2.3.8 beschrieben, mit OVA behandelt, bevor 24 h nach der DZ-/B-Zell-Co-Kultur die T-Zellen in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml zugegeben wurden. Die Kultur aller drei Zelltypen wurde gemeinsam für 72 h bei 37°C inkubiert (vgl. Abbildung 1).

## Vergleich der Versuchsabläufe:

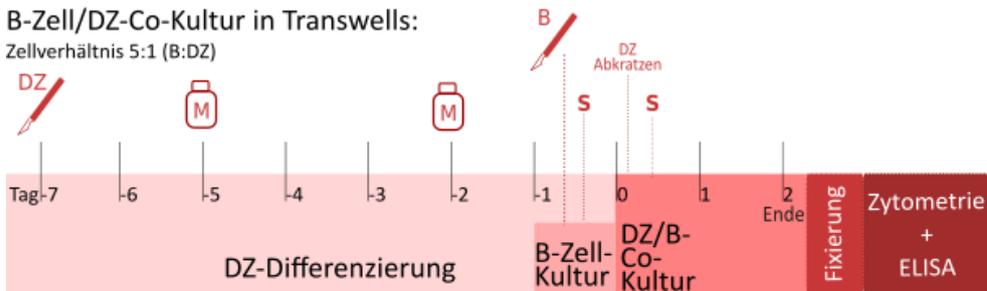
### T-Zell-Proliferationsassay:

Zellverhältnis 1:1, 5:1, 10:1 (B:T)



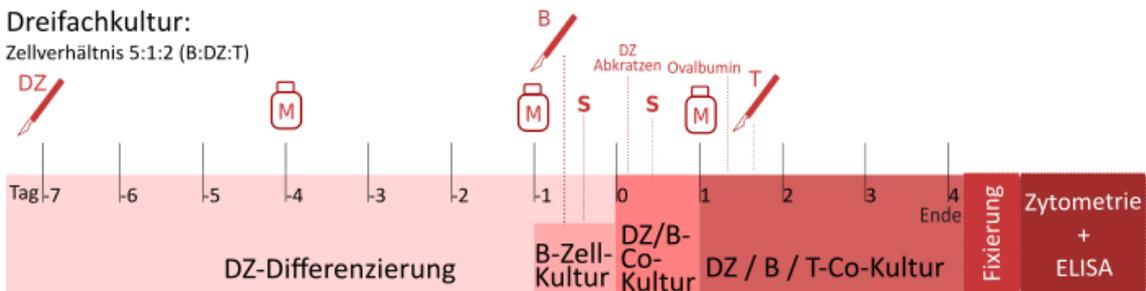
### B-Zell/DZ-Co-Kultur in Transwells:

Zellverhältnis 5:1 (B:DZ)



### Dreifachkultur:

Zellverhältnis 5:1:2 (B:DZ:T)



 = Maus-Präparation + Zell-Isolation  
B-Zellen (B), T-Zellen (T), dendritische Zellen (DZ)

 = Medium-Wechsel

**S** = Stimulation mit *B. vulgatus* und *E. coli*

Abbildung 1. Darstellung der Zeitverläufe der Co-Kultur-Experimente.

Vergleichend dargestellt sind die zeitlichen Abläufe in den Co-Kultur-Experimenten und die verwendeten Zellverhältnisse.

## **2.2.4 Fixierung, Färbung und Vorbereitung der Durchflusszytometrie**

### 2.2.4.1 Fixierung und FACS-Färbung der B-Zellen

Die Zellsuspensionen wurden aus den Wells entnommen und in Eppendorfgefäßen bei 400 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für spätere Analysen bei -20°C aufbewahrt.

Das Zellpellet wurde für 15 min mit 300 µl Fc-Block resuspendiert, um unspezifische Bindungen abzublocken. Nach der Inkubation und einem Waschschrift (Zugabe von 1 ml PBS/FCS und Zentrifugation bei 400 x g, 4°C mit anschließender Resuspension) konnte die Lebend-Tot-Färbung (Life-Dead-Staining) durchgeführt werden.

Nun erfolgten zwei weitere Waschschriffe, bevor die Zellen mit 200 µl Cytofix/Cytoperm pro Pellet fixiert und in ihrer Zellmembran durchlässig gemacht wurden. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur, einer Vorverdünnung mit PBS/FCS und Zentrifugation bei 400 x g, 4°C wurde das Pellet mit 200-500 µl PBS/FCS resuspendiert und im Kühlschrank bei 4°C bis zur FACS-Analyse aufbewahrt.

Alle Proben wurden nun in ihren Eppendorfgefäßen 5 min bei 550 x g zentrifugiert und der entstandene Überstand abgenommen. Die Pellets wurden in Perm/Wash-Puffer (85% PBS, 10% Saponin und 5% FCS) resuspendiert. In mehreren 96-Well-Platten wurden nun zunächst die Proben aufgetragen. Dabei wurde jede Probe (z. B. Maus 1, Mock, 0 h) mit je 100 µl auf mehrere Wells entsprechend den verschiedenen Färbungsansätzen in der B-Zell-Charakterisierung aufgeteilt.

Für jede Färbung wurde ein Mastermix mit den vorher zusammengestellten Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern und PBS/FCS hergestellt. Von diesem Mastermix wurden 50 µl in jedes Well der Färbung pipettiert. Der Mastermix wurde pro zu färbende Probe aus 50 µl PBS/FCS und 0,5 µl Antikörper für jedes Oberflächenprotein und 1 µl Antikörper für intrazelluläre Proteine zusammengestellt.

Die B-Zell-Charakterisierung erfolgte mit folgenden Fluoreszenzen: Bv421 (CD19), Bv605 (CD5, CD21), Alexa Fluor 647 (CD1d), PE (IL-10, Tim-1), BB515 (CD23), Alexa Fluor 700 (CD24), APZ (Foxp3, CD40), FITC (B220, MHC-II), PerCP-Cy5.5 (CD80), PE-Cy7 (CD86) und eFluor 780 (Life-Dead-Färbung, wurde auf dem APC-Cy7-Kanal gemessen). CD19 ist ein guter Identifikationsmarker für B-Zellen, der in nahezu allen B-Zell-Entwicklungsstadien exprimiert wird, ähnlich wie die CD45-Isoform B220. CD5, CD1d und IL-10 charakterisieren die Population der B10-Zellen. Tim-1 ist ebenfalls ein Marker, der B<sub>regs</sub> identifiziert und gleichzeitig eine Rolle in der IL-10-Produktion spielt. Der Phänotyp der regulatorischen *transitional 2 marginal-zone precursor cells* (T2-MZP) beinhaltet außer CD19 auch noch die Moleküle CD21, CD23 und CD24. MHC-II wurde für die Analyse ausgewählt, weil über dieses Molekül der Großteil der Funktion der Antigenpräsentation ausgeübt wird. CD40 ist eines der wichtigsten co-stimulatorischen Moleküle des B-Zell-Rezeptors und aktiviert intrazelluläre Signalkaskaden. Ebenso können CD80 und CD86 bei der Regulation des Aktivierungszustands der B-Zellen mitwirken. Eine Untersuchung von Foxp3 ist interessant, da für diesen Transkriptionsfaktor schon eine regulatorische Funktion in T-Zellen bekannt ist (vgl. Miura et al., 2004, Hori et al., 2003).

Anschließend wurden für jede Färbung einzeln Kontrollen angefertigt, die entweder nur einen Fluoreszenzfarbstoff oder alle anderen, außer diesem einen Farbstoff enthielten (*Fluorescence minus one* = FMO). Alle Platten wurden 30 min im Kühlschrank inkubiert, 5 min bei 550 x g zentrifugiert und zwei Mal mit Perm/Wash gewaschen, bevor die Proben in PBS/1% FCS-Suspension in FACS-Röhrchen überführt wurden.

Für den Nachweis weiterer regulatorischer Moleküle wurden sieben separate Färbesettings angelegt, da alle Marker mit PE-gekoppelten Antikörpern zu detektieren waren. Gemessen wurde die Expression von Fas-Ligand, Gitr-Ligand, PD-1-Ligand, CD73, Tim-1, IL-10-Rezeptor und *Ebi3*.

#### 2.2.4.2 Fixierung und FACS-Färbung der dendritischen Zellen

Nach der Stimulationszeit wurden alle Zellen aus den Wells gespült und in Eppendorfgefäßen 5 min bei 440 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden für ELISAs bei -20°C weggefroren. Das Zellpellet wurde in je 300 µl Fc-Block resuspendiert und für 20 min inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS/FCS wurden die Zellen für 30 min in 200 µl Cytofix/Cytoperm fixiert und anschließend erneut mit Perm/Wash gewaschen. In einer 96-Well-Platte wurden die Proben mit 50 µl des Fluoreszenzantikörpercocktails resuspendiert und nach 30 min Inkubation wiederholt gewaschen. Der DZ-Masternmix enthielt CD11c (APC), MHC-II (FITC), CD40 (Bv421), CD80 (PerCP-Cy5.5) und CD86 (PE-Cy7). Für die Bestimmung der Maturation der dendritischen Zellen wurden die Oberflächenmoleküle CD11c, sowie MHC-II, CD40, CD80 und CD86 gemessen.

#### 2.2.4.3 Fixierung und FACS-Färbung der T-Zellen

Das Procedere entsprach im Allgemeinen dem der B-Zell-Versuche. Allerdings wurde hier kein Leukozyten-Aktivierungscocktail verwendet. Die unterschiedlichen Co-Kulturen (nur B-Zellen, B-/T-Zellen mit und ohne CFSE, etc.) wurden aufgeteilt, um sie mit unterschiedlichen FACS-Färbesettings zu färben: Die erste T-Zell-Färbung enthielt Vβ 5.1, 5.2 (Bv 605), CD4 (APZ), CD19 (Bv 421), und CFSE (FITC). Die zweite T-Zell-Färbung setzte sich aus Vβ 5.1, 5.2 (Bv 605), CD4 (Bv 421), IL-17A (APZ-Cy7), IFN-γ (PE-Cy7), IL-4 (PE) und Foxp3 (AF 647) zusammen. Um die T-Zellen später eindeutig identifizieren zu können, wurde die Vβ-Untereinheit des T-Zell-Rezeptors gewählt. Außerdem diente CD19 dem Ausschluss von B-Zellen. CD4 ist ein typisches Oberflächenprotein von T-Helferzellen im Immunsystem. Der Farbstoff CFSE eignet sich gut, um gezielt einzelne Generationen einer Zellpopulation voneinander zu unterscheiden, da sich der Farbstoff intrazellulär stabil an unterschiedliche Moleküle anlagert und bei jeder Zellteilung in etwa hälftig auf beide Zellen aufgeteilt wird. Interleukin-17A (IL-17A) charakterisiert unter anderem T-Helferzellen Typ 17 und IFN-γ ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das vorwiegend von T-Helferzellen Typ 1 sezerniert wird. Auch

Interleukin-4 (IL-4) wird von T-Zellen produziert, wirkt aber gleichzeitig mit zahlreichen Effekten parakrin und autokrin auf T-Zellen zurück.

#### 2.2.4.4 Herstellung von Kompensationsbeads

Zur Kompensation von Streustrahlung der einzelnen Fluoreszenzen in andere Detektoren wurden Kompensationsbeads hergestellt. Dazu wurde je ein Tropfen *Invitrogen Ultra Compensation Beads* mit 100 µl PBS/FCS und 1 µl eines Fluoreszenzfarbstoffes resuspendiert. Nach 15 min Inkubation, 5 min Zentrifugation bei 650 x g und Entfernung des Überstands wurde das Pellet in 100 µl PBS/FCS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt.

Dieses Procedere wurde für jede einzelne Fluoreszenz-Färbung durchgeführt.

#### **2.2.5 Durchflusszytometrie**

Das Prinzip der Durchflusszytometrie ermöglicht eine quantitative Messung Fluoreszenz-markierter Oberflächenmoleküle und intrazellulärer Proteine. Die Markierung basiert auf dem Prinzip der Bindung zwischen Antigen (also der zu markierenden Struktur) und dem mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten, für eine bestimmte Struktur spezifischen Antikörper.

In einer dünnen Kapillare wurden die Zellen einzeln mit Laserstrahlung in bis zu sechs verschiedenen Wellenlängen angeregt. In dieser Arbeit wurden drei Laser in violett (405 nm), blau (488 nm) und rot (640 nm) verwendet. Das emittierte Lichtspektrum wurde von mehreren Detektoren aufgefangen und den Fluoreszenzfarbstoffen zugeordnet. Darüber wurden indirekt die Zellmoleküle nachgewiesen und quantifiziert.

Mit dem BD LSRFortessa™ Cell Analyzer wurden die vorbereiteten FACS-Röhrchen einzeln analysiert und die erhobenen Daten in der FACSDiva-Software zugeordnet und zielgerichtet aufgenommen. Hier erfolgte auch schon eine grobe Auswertung, die anschließend mit der Software FlowJo noch differenzierter gestaltet werden konnte.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde mit dem Programm GraphPad PRISM 7 ausgearbeitet.

### **2.2.6 Auswertung mittels FlowJo und GraphPad Prism**

In der Software FlowJo V10 konnten die Rohdaten weiterverarbeitet werden und durch lineares Gating einzelne Subpopulationen definiert werden (Abbildung 2). Nur die mit dem Gate ausgewählte Population wurde im nächsten Analysefenster weiterbearbeitet. Im Forward-Side-Scatter wurde zunächst eine Gesamtpopulation ausgewählt und Zelltrümmer daraus ausgeschlossen. Anschließend wurden Dubletten aufgrund ihres veränderten Verhältnisses von Höhe des Signalpeaks (FSC-H) zur Zellgröße (FSC-A) ausgeschlossen, um nur noch mit Einzelzellen weiter arbeiten zu können (Abbildung 2B).

Die dargestellten Punkte entsprechen gemessenen Events, nicht aber ganz exakt einzelnen Zellen. In unserer Auswertung haben wir daher nur mit den prozentualen Anteilen der gemessenen Events gearbeitet.

Die Schwelle, ab der eine Fluoreszenz als positiv akzeptiert wurde, wurde anhand stimulierter, aber ungefärbter Kontrollzellen gesetzt. Dabei durften maximal 2,5 % der Events über der Positivschwelle liegen.

Mittels GraphPad Prism wurden schließlich die absoluten und prozentualen Zahlen der Subpopulationen in Diagrammen dargestellt und statistisch analysiert.

Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurden die Werte der biologischen oder technischen Replikate auf Normalverteilung geprüft. War diese gegeben, wurde ein zweiseitiger, ungepaarter, parametrischer t-Test mit einem Konfidenzlevel von 95 % durchgeführt. Andernfalls wurde die Signifikanz über den Mann-Whitney-Test ermittelt.

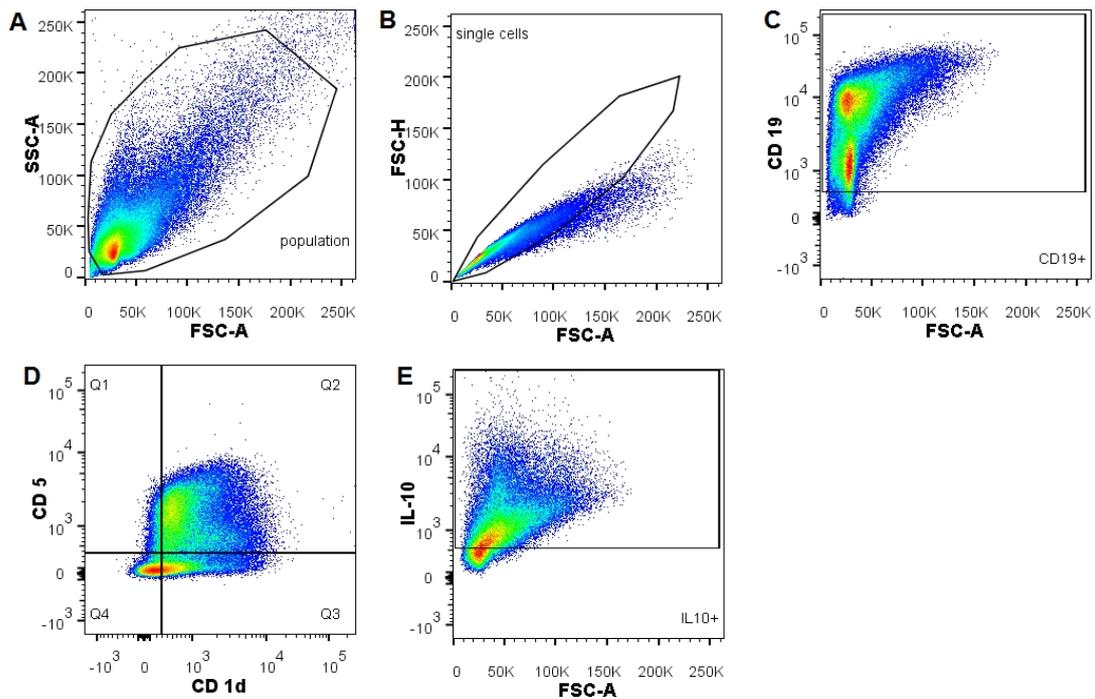


Abbildung 2: Exemplarisches Gating mit FlowJo

Mit der Software FlowJo wurden die Rohdaten linear auf Subpopulationen analysiert. In diesem exemplarischen Gating stellt der Inhalt jedes Auswahlrahmens die Grundgesamtheit für die nächste Auswahlstufe dar. Die Daten hier stammen von einer E. coli mpk-Probe aus einem B-Zell-Charakterisierungsexperiment nach Stimulation. (A) zeigt alle gemessenen Events in einem Diagramm mit der Größe (Forward Scatter = FSC) gegen die Granularität (Side Scatter = SSC) aufgetragen. Daraus wurde eine Grundpopulation ausgewählt, die Zellfragmente an den Achsen ausgrenzt. Um Dubletten von einzelnen Zellen zu unterscheiden, wurden die Zellen in ihrer Fläche (FSC-A) gegen die Höhe des Signalpeaks (FSC-H) eingeordnet (B). Dabei sollte die Korrelation bei einzelnen Zellen nahe 1 sein – also eine Diagonale mit 45° durch den Nullpunkt bilden – weshalb das Gate auf diese Weise gesetzt wurde. Anhand ungefärbter Kontrollen und FMO-Proben wurde eine Schwelle festgelegt, über der das Signal als positiv, hier bspw. für CD19 Pacific Blue, gewertet wurde (C). In (D) wurden die Marker CD1d Alexa Fluor 647 und CD5 Qdot 605 gleichzeitig aufgetragen, um in Q2 die doppel-positive Population zu erhalten, mit der weiter gearbeitet wurde. Daraus konnten nun in (E) die IL-10 PE positiven Events definiert werden. Dieses lineare Gating ergab hier die Subpopulation der B10-Zellen (CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> CD1d<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>). CD = Cluster of differentiation, FMO = Fluorescence minus one, IL = Interleukin

### **2.2.7 Zytokinbestimmung mittels ELISA**

Zur Zytokinbestimmung wurde hier die Methode des *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) gewählt, bei der ein bestimmtes Zytokin an einen spezifischen stationären Primärantikörper bindet und gleichzeitig auf der anderen Seite von einem Sekundärantikörper gebunden wird. Dieser Sekundärantikörper setzt ein Substrat zu einem Produkt um, welches den Extinktionswert der Probe verändert und somit proportional zur Menge des Zytokins ist.

Die eingefrorenen Überstände der verschiedenen Mono- und Co-Kulturen wurden mittels ELISA auf ihre Zytokinkonzentration untersucht. Damit sollten die vor der Fixierung von den Zellen sezernierten und damit im FACS nicht mehr erfassbaren Zytokine gemessen werden.

Je nach zu analysierendem Zytokin (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) wurden spezifische Kits entsprechend den Herstellerangaben angewendet.

Mit dem TECAN infinite F50 ELISA Reader und der Software Magellan for 50 wurden die Proben gemessen.

### **2.2.8 Fluoreszenzmikroskopie von B-Zellen und dendritischen Zellen**

#### 2.2.8.1 Co-Kultur mit B-Zellen und KGDZs

Beide Zelltypen wurden getrennt voneinander isoliert und stimuliert (vgl. 2.2.3.2 und 2.2.3.3). Nach 48 h Inkubation wurde die B-Zell-Monokultur aus den 6-Wells geerntet, gepoolt, in zwei Falcons übertragen und 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden in B-Zell-Medium resuspendiert und mithilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt.

Aus den Wells der DZ-Kulturplatte (24 h nach deren Stimulation) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Nun wurden die quantifizierten B-Zellen im Verhältnis 1:1 zu den DZ aufgetragen. Zuvor wurde auf den Boden jeder Vertiefung der 24-Well-Platte ein autoklaviertes Coverslip gelegt, um darauf die DZ zu kultivieren. Anschließend wurde mit Lymphozytenmedium auf 500  $\mu$ l aufgefüllt und die Kulturplatte für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Die stimulierten B-Zellen, die für die Monokultur-

Färbung vorgesehen waren, verblieben noch einen weiteren Tag in den 6-Well-Platten und wurden kurz vor der Fixierung aller Zellen auf ein Coverslip getropft.

#### 2.2.8.2 Fixierung und Färbung der Co-Kultur

Zunächst wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. Um das sofortige Abschwemmen der B-Zellen bei der Fixierung zu vermeiden, wurden alle Coverslips kurzzeitig zum Antrocknen offengelegt. Dann wurden die Zellen mit 300 µl 4%igen Paraformaldehyds fixiert. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand erneut abgenommen und je 500 µl PBS in die Wells gegeben. Zur Färbung wurden eine Färbewanne mit Plexiglasscheibe und Waschgefäße mit PBS-Flüssigkeit verwendet. Zum Blocken wurden die Coverslips eine halbe Stunde mit der Zellseite nach unten in einen 40 µl-Tropfen PBS/1% FCS gelegt und anschließend drei Mal gewaschen.

Die Coverslips wurden nun bei 4°C über Nacht in einem 40 µl-Tropfen des ungekoppelten Primärantikörpers (Verdünnung 1:100) gegen murines CD19 inkubiert. Am nächsten Morgen wurde gewaschen und die Coverslips dann erneut 1 h in eine 1:100 Verdünnung des Sekundärantikörpers Anti-rat Cy2 gelegt. Eine Auswahl der Coverslips wurde zusätzlich auch mit Phalloidin TRITC (Verdünnung 1:500) gefärbt, weshalb diese Zellen zunächst 10 min mit 0,2%iger Triton-X100-Lösung permeabilisiert und anschließend gewaschen werden mussten. Dann konnten sie 20 min in einem 40 µl-Tropfen des roten Farbstoffes inkubiert und erneut gewaschen werden. Alle Präparate wurden zusätzlich mit DAPI der Konzentration 1 µg/ml gefärbt, 20 min inkubiert und ein letztes Mal gewaschen.

Schließlich wurde für jedes Coverslip ein kleiner Tropfen (7 µl) Mowiol-Mounting-Medium auf die Objektträger gesetzt und die Coverslips mit der Zellseite nach unten darauf leicht festgedrückt, sodass alle Luftblasen verschwanden.

#### 2.2.8.3 Aufnahmemodus mit der ZEN-Software am Carl Zeiss LSM 710

Die Aufnahmen der Fluoreszenzbilder wurden über die ZEN-Software gesteuert, die mit dem konfokalen Mikroskop des Typs LSM 710 von Carl Zeiss

verknüpft war. Einige Bilder entstanden im Mono-Layer-Modus, andere wurden über Z-Stacks in 6-10 Schichten aufgenommen und anschließend vom Programm übereinandergelegt. Die Zuschnitte der Bilder erfolgten mit Adobe Photoshop.

### 3 Ergebnisse

Teile der im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht in der Fachzeitschrift *Frontiers in immunology* (Maerz et al., 2020, CC BY 4.0) (siehe jeweilige Abbildungsunterschriften).

#### 3.1 *E. coli* mpk induziert regulatorische B-Zell-Subtypen

##### 3.1.1 *B<sub>reg</sub>*-Subtypen und andere Oberflächenmarker

In diesem Versuch wurde die Hypothese untersucht, ob eine *E. coli* mpk-Stimulation eine stärkere Entwicklung von Subpopulationen regulatorischer B-Zellen hervorruft als eine Stimulation mit dem Symbionten *B. vulgatus* mpk. Außerdem sollte das Auftreten verschiedener anderer Moleküle, die im Zusammenhang mit diesen Subtypen stehen oder regulatorische Eigenschaften vermitteln können, analysiert werden.

Zusätzlich zu den Wildtyp-Zellen (WT) wurden Zellen von TLR2/TLR4-Knockout-Mäusen (KO) verwendet, um die Abhängigkeit der bakteriellen Stimulation von diesen beiden Rezeptoren zu beobachten.

Die Population der unstimulierten B-Zellen ist nach einiger Zeit stark minimiert, während *E. coli* mpk-stimulierte Proben auch nach 72 h eine viable B-Zell-Population aufweisen (Abbildung 3 A-C). Aus dem Verhältnis von toten zu lebenden Zellen resultiert Abbildung 3 D, in der der prozentuale Anteil aller lebenden Zellen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten dargestellt ist. Deutlich erkennbar fällt die Kurve der noch lebenden Zellen in den drei KO-Ansätzen und der WT-Negativkontrolle ohne Stimulation (Mock) bereits einen Tag nach der Stimulation stark ab und befindet sich nach drei Tagen Kultur bei nahezu 0 %. Die *B. vulgatus* mpk-stimulierten Zellen zeigen einen ähnlichen Verlauf der Kurve, die sich aber konstant 5-10 Prozentpunkte über den KO- und Mock-Proben befindet. Im Gegensatz dazu entwickeln sich die *E. coli* mpk-stimulierten B-Zellen: nach 24 h ist zunächst ein Abfall der lebenden Zellen auf ca. 54 % zu beobachten. Danach stabilisiert sich der Anteil vitaler Zellen auf einem konstanten Niveau von 59 %.

Der zeitliche Verlauf der Entwicklung der B10-Zell-Population ist in Abbildung 4 A zu sehen, in der sich schon nach 24 h signifikante Effekte der *E. coli* mpk-Stimulation gegenüber Mock (Negativkontrolle) und *B. vulgatus* mpk zeigen, die auch im Laufe der Zeit noch stärker werden. Schließlich erreicht die Population der B10-Zellen sogar Anteile von knapp 50 % aller B-Zellen. Ab 48 h nach Stimulation zeigt aber auch die Stimulation durch *B. vulgatus* mpk eine signifikante Erhöhung dieser regulatorischen Zellpopulation. Allerdings ist hier zu beobachten, dass der Anteil über die Zeit nur relativ größer wird, da bei fehlender Stimulation und den KO-Proben die Anteile der regulatorischen Population sinken.

Abbildung 4 B stellt den Verlauf der Population des B<sub>reg</sub>-Subtyps *transitional 2 marginal-zone precursor*-Zellen (T2-MZP; Phänotyp CD19<sup>+</sup> CD21<sup>+</sup> CD23<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup>) dar. Diese Population ist schon von Beginn an in allen drei Stimulationsansätzen inklusive der KO-Zellen mit etwa 50 – 65 % der gesamten B-Zellpopulation ausgeprägt. Über die verschiedenen Zeitpunkte hinweg sinkt der Anteil dieser regulatorischen Zellpopulation stark ab, außer in den *E. coli* mpk-stimulierten Proben. Somit ist der Anteil von erneut 50 – 60 % nach 48 h und 72 h eindeutig signifikant gegenüber unstimulierten und *B. vulgatus* mpk-stimulierten Proben. Mit deutlich geringeren prozentualen Anteilen zeigt aber auch die *B. vulgatus* mpk-Stimulation zu diesen späten Zeitpunkten einen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle.

Des Weiteren wurden noch einzelne Moleküle gemessen, deren Expressionsverläufe in Abbildung 4 C-E und Abbildung 5 zu sehen sind.

Die Expression des *major histocompatibility complex II* (MHC-II) wurde hier mit der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) beschrieben, da sich durch Stimulation und Zeitverlauf weniger die Anzahl der MHC-II-positiven Zellen verändert hat, als vielmehr die Häufigkeit der exprimierten Moleküle auf der Oberfläche jeder Zelle. Dadurch war ein Shift in der Population erkennbar, der sich durch die MFI beschreiben lässt. Gleiches gilt für CD86 und IgM.

Für MHC-II, CD80 und CD86, welches alle wichtige Marker für die Maturation und Antigen-Präsentation sind, ist zu beobachten, dass zum Zeitpunkt 0 h

weder die Stimulation noch der Genotyp einen Effekt auf die Expression zeigt. Nach 24 h und auch zu den späteren Zeitpunkten ist dann aber in *E. coli* mpk stimulierten Proben die Expression von MHC-II, CD86 und IgM signifikant stärker als in allen anderen Ansätzen. Die Stimulation durch *B. vulgatus* mpk zeigt ab 24 h (MHC-II) bzw. ab 48 h (CD86 und IgM) ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Expression, die allerdings in Relation zu der Veränderung durch *E. coli* mpk sehr gering ist.

Der Transkriptionsfaktor Foxp3 sowie die Oberflächenmoleküle CD80 und Tim-1 sind in Abbildung 4 D und Abbildung 5 A und B mit Prozentangaben dargestellt. Foxp3, der als Marker für regulatorische T-Zellen bekannt ist, ist über die gesamte Zeitreihe hinweg in den Knockout-B-Zellen um rund 5-10 Prozentpunkte geringer exprimiert als in den Wildtyp-Zellen. In letzteren ist der Faktor schon zu Beginn in nahezu jeder zweiten Zelle vorhanden, wird aber nach 48 *E. coli* mpk-Stimulation auf signifikant mehr Zellen der B-Zell-Population exprimiert als nach anderen Stimuli. Zu diesem und dem folgenden Zeitpunkt enthalten knapp 80 % der B-Zellen Foxp3.

Die Expression von CD80 und Tim-1 zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf: Bei 0 h werden die Marker unabhängig vom Stimulus auf rund 20 % der B-Zellen exprimiert. Nach 24 h steigt dieser Anteil in *E. coli* mpk-WT-Proben schon erkennbar an und erreicht nach 48 h signifikante Maximalwerte von 60 % (CD80) bzw. 50 % (Tim-1). Alle anderen Ansätze zeigen eine kontinuierliche Abnahme in der Markerexpression über die Zeit.

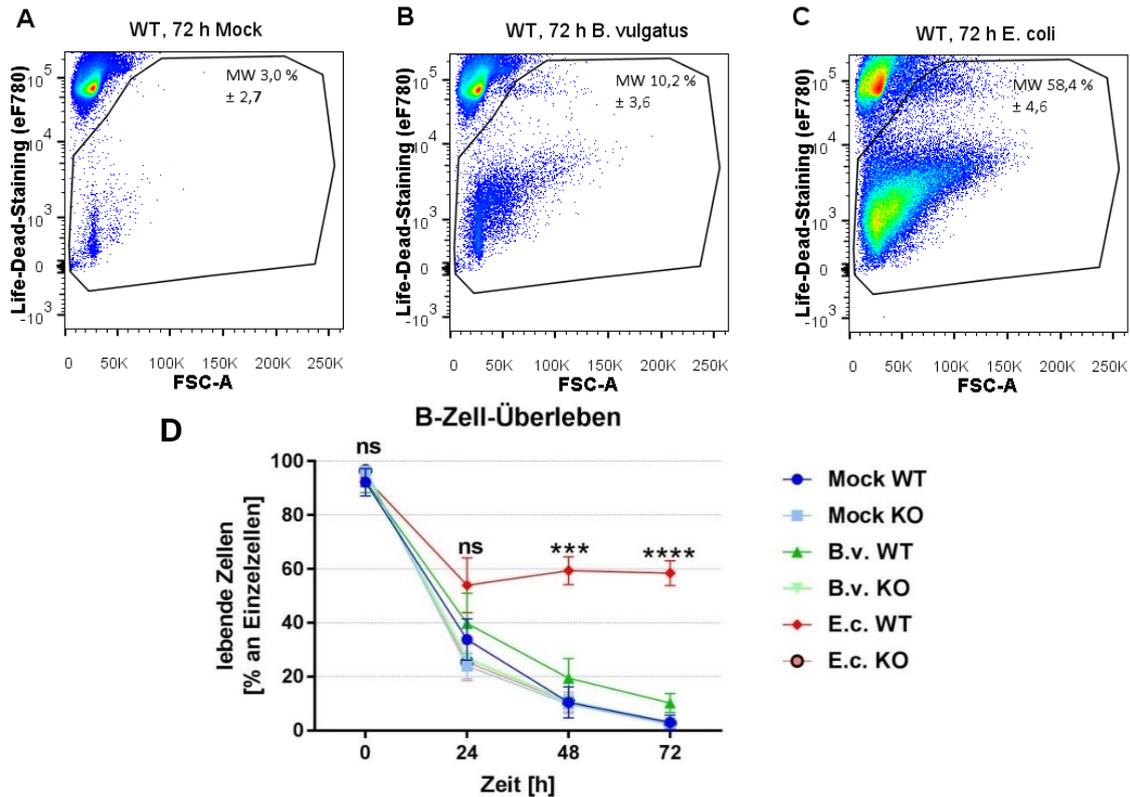


Abbildung 3. *E. coli* mpk-Stimulation ermöglicht ein längeres Überleben der B-Zell-Population in Kultur. Wildtyp- und TLR2/4-Knockout-B-Zellen wurden über 0 bis 72 h mit Mock (Negativkontrolle), *Bacteroides vulgatus* (*B. v.*) und *Escherichia coli* (*E. c.*) MOI 1 stimuliert. Etwa vier Stunden vor Abnahme der jeweiligen Zeitpunkte wurde ein Leukozytenaktivierungscocktail (LAC) zugegeben, um die Zytokinproduktion gleichzeitig anzuregen und deren Sekretion zu verhindern. Nach Fixierung wurden die Proben mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. In A – C sind die Dotplots verschiedener Beispielproben der Durchflusszytometrie dargestellt, die innerhalb des Gates die Population der lebenden Zellen enthalten. Zuvor wurden Dubletten in der FSC-A/FSC-H-Darstellung herausgegated. Schaubild D zeigt den prozentualen Anteil der lebenden B-Zellen an allen gemessenen Einzelzellen über die Zeit. Tote Zellen wurden über die Aufnahme des Life-Dead-Farbstoffes eFluor 780 identifiziert. Der statistische Vergleich erfolgte zwischen *E. coli* mpk- und *B. vulgatus* mpk-stimulierten Proben. Die statistische Auswertung auf Signifikanz erfolgte bei Normalverteilung mit einem T-Test und andernfalls mit einem Mann-Whitney-Test. Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde zuvor auf Gauß'sche Verteilung geprüft. Die Balken bzw. Punkte zeigen die Mittelwerte aller Replikate ( $n = 4$ ) mit Standardabweichung in Form von Fehlerbalken. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; ns = nicht signifikant Stimuli: Mock = unstimulierte Kontrolle, *B. v.* = *Bacteroides vulgatus*, *E. c.* = *Escherichia coli* Genotypen: WT = Wildtyp, KO = Toll-Like-Rezeptor-2/4-Knockout CD = Cluster of Differentiation

Teile der Daten und Abbildung bereits so publiziert (Maerz et al., 2020).

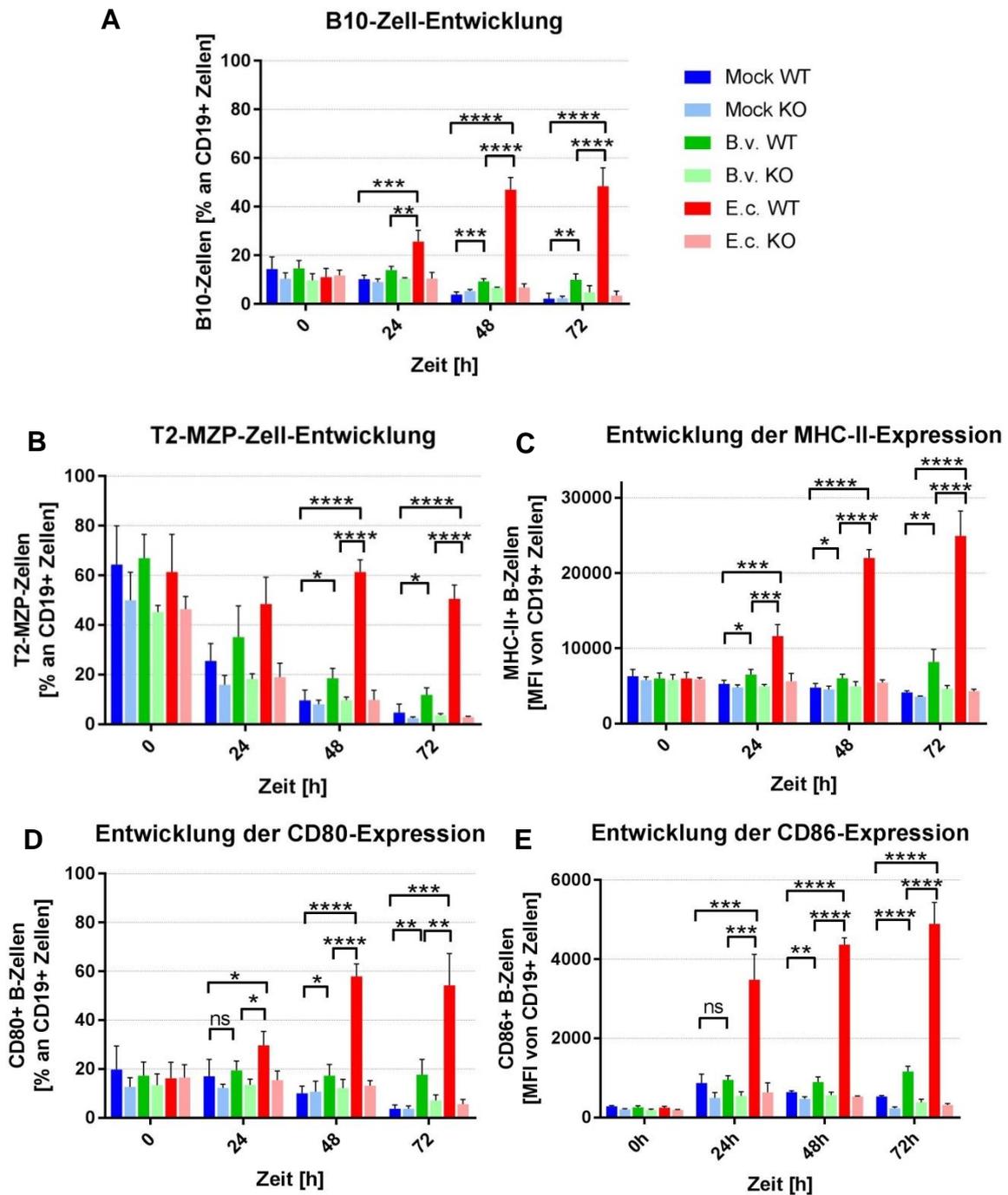


Abbildung 4. *E. coli mpk*-Stimulation fördert die regulatorischen B-Zell-Subtypen B10- und T2-MZP-Zellen. Wildtyp- und TLR2/4-Knockout-B-Zellen wurden über 0 bis 72 h mit Mock (Negativkontrolle), *Bacteroides vulgatus* (*B. v.*) und *Escherichia coli* (*E. c.*) MOI 1 stimuliert. Etwa vier Stunden vor Abnahme der jeweiligen Zeitpunkte wurde ein Leukozytenaktivierungscocktail (LAC) zugegeben, um die Zytokinproduktion gleichzeitig anzuregen und deren Sekretion zu verhindern. Nach Fixierung mit Cytofix/cytoperm wurden die Proben mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

In A ist der prozentuale Anteil der B10-Zellen (Phänotyp CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> CD1d<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>) aufgeführt. B zeigt den Anteil des Subtyps regulatorischer B-Zellen mit Namen *transitional 2 marginal-zone precursor*-Zellen (Phänotyp CD19<sup>+</sup> CD21<sup>+</sup> CD23<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup>).

In C – E ist die Entwicklung weiterer Oberflächenmarker über die Zeit dargestellt (Daten publiziert in Maerz et al., 2020). Die Schaubilder C und E zeigen dabei keine prozentualen Werte, sondern die MFI (*mean fluorescence intensity*). Diese errechnet sich aus dem Mittelwert der Fluoreszenzintensität.

Die statistische Auswertung auf Signifikanz erfolgte bei Normalverteilung mit einem T-Test und andernfalls mit einem Mann-Whitney-Test. Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde zuvor auf Gauß'sche Verteilung geprüft. Die Balken bzw. Punkte zeigen die Mittelwerte aller Replikate (n = 4) mit Standardabweichung in Form von Fehlerbalken. \* p <= 0,05; \*\* p <= 0,01; \*\*\* p <= 0,001; \*\*\*\* p <= 0,0001, ns = nicht signifikant  
Stimuli: Mock = unstimulierte Kontrolle, *B. v.* = *Bacteroides vulgatus*, *E. c.* = *Escherichia coli*  
Genotypen: WT = Wildtyp, KO = Toll-Like-Rezeptor-2/4-Knockout  
CD = *Cluster of Differentiation*, IgM = Immunglobulin M, MHC = *major histocompatibility complex*

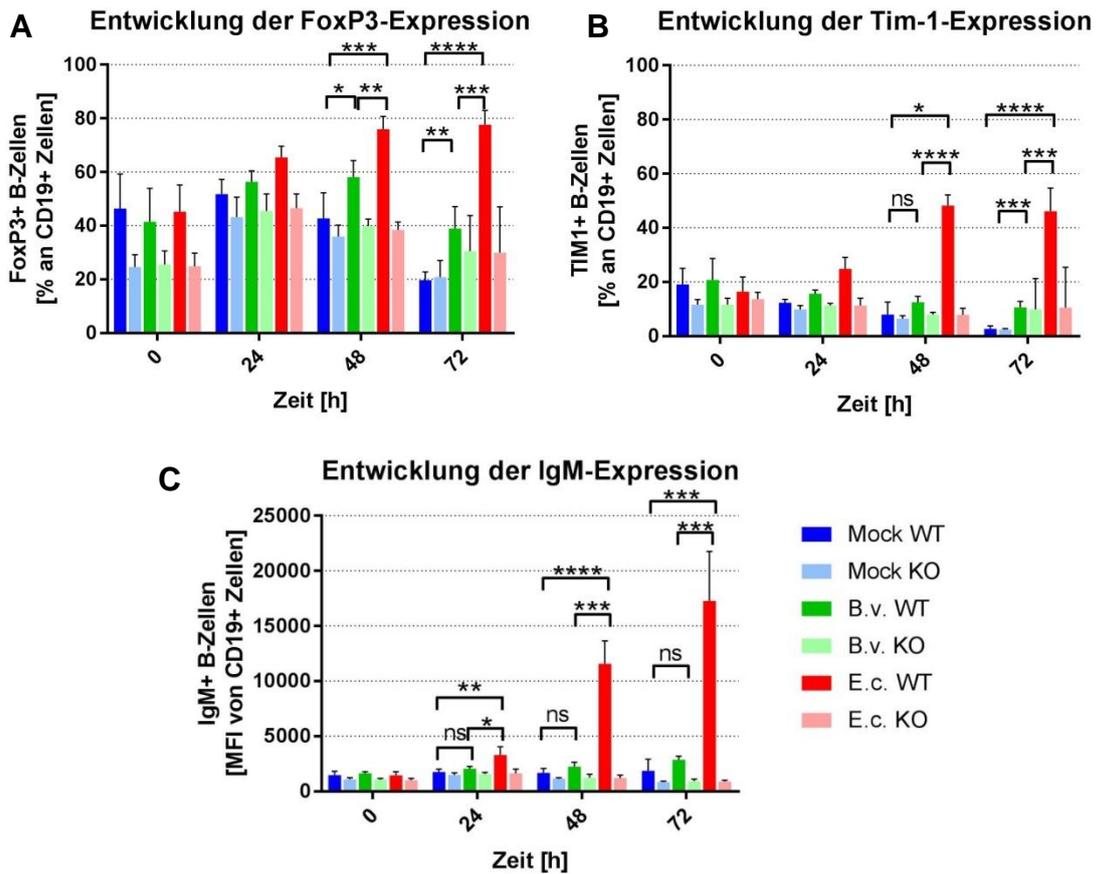


Abbildung 5. *E. coli* *mpk* induziert erhöhte Expression von *Foxp3*, *Tim-1* und *IgM*.

Wildtyp- und TLR2/4-Knockout-B-Zellen wurden über 0 bis 72 h mit Mock (Negativkontrolle), *Bacteroides vulgatus* (*B. v.*) und *Escherichia coli* (*E. c.*) MOI 1 stimuliert. Etwa vier Stunden vor Abnahme der jeweiligen Zeitpunkte wurde ein Leukozytenaktivierungscocktail (LAC) zugegeben, um die Zytokinproduktion gleichzeitig anzuregen und deren Sekretion zu verhindern. Nach Fixierung wurden die Proben mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

In A und B sind die Entwicklungen des regulatorisch wirksamen Transkriptionsfaktors *Foxp3* und des Oberflächenmoleküls *Tim-1* in Prozent der Gesamt-B-Zell-Population über die Zeit dargestellt. Das Schaubild C (bereits publiziert in Maerz et al., 2020) zeigt dabei für die Entwicklung der *IgM*-Expression keine prozentualen Werte, sondern die MFI (*mean fluorescence intensity*). Diese errechnet sich aus dem Mittelwert der Fluoreszenzintensität.

Die statistische Auswertung auf Signifikanz erfolgte bei Normalverteilung mit einem T-Test und andernfalls mit einem Mann-Whitney-Test. Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde zuvor auf Gauß'sche Verteilung geprüft. Die Balken bzw. Punkte zeigen die Mittelwerte aller Replikate ( $n = 4$ ) mit Standardabweichung in Form von Fehlerbalken. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; ns = nicht signifikant

Stimuli: Mock = unstimulierte Kontrolle, *B. v.* = *Bacteroides vulgatus*, *E. c.* = *Escherichia coli*

Genotypen: WT = Wildtyp, KO = Toll-Like-Rezeptor-2/4-Knockout

*Foxp3* = *Forkhead Box Protein 3*, *IgM* = Immunglobulin M, *Tim-1* = *T cell immunoglobulin and mucin domain protein 1*

### **3.1.2 *E. coli* mpk-stimulierte B-Zellen produzieren mehr IL-10 und -6**

Zusätzlich zur Charakterisierung der B-Zell-Subtypen über ihre Oberflächenmarker werden besonders die B10-Zellen durch ihre IL-10-Produktion definiert. Zytokine dienen den Immunzellen zur Kommunikation mit anderen Zellen ebenso wie der Selbstregulation durch autokrine Effekte, die über Feedback-Schleifen auf die sezernierende Zelle selbst zurückwirken.

An dieser Stelle wurden ELISAs für die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie das als anti-inflammatorisch bekannte Zytokin IL-10 durchgeführt. Gemessen wurde dabei nur die nach extrazellulär sezernierte Zytokinmenge zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Stimulation.

IL-6 wurde von *E. coli* mpk-stimulierten B-Zellen (Wildtyp) zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h signifikant mehr produziert als von unstimulierten Zellen oder im Vergleich mit *B. vulgatus* mpk-stimulierten Zellen (Abbildung 6 A). Aber auch *B. vulgatus* mpk stimulierte Wildtypzellen zeigten eine signifikant höhere IL-6-Produktion gegenüber der Negativkontrolle zu diesen drei Zeitpunkten. Zum Zeitpunkt 72 h lagen die höchsten gemessenen IL-6-Konzentrationen bei ca. 900 pg/ml. Die Zellen aus TLR-Knockout-Mäusen reagierten zu keinem Zeitpunkt und unabhängig des Stimulus mit einer IL-6-Erhöhung.

Die TNF- $\alpha$ -Sekretion zeigte nahezu keine Veränderungen im zeitlichen Verlauf und wies auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlich stimulierten Zellen auf (Abbildung 6 B). Die gemessenen Konzentrationen befanden sich im Intervall zwischen 20 und 50 pg/ml. Allein der Vergleich mit den Knockout-B-Zellen zeigte, dass diese signifikant geringere Mengen TNF- $\alpha$  produzierten.

Das als anti-inflammatorisch und charakterisierend für regulatorische B10-Zellen geltende Zytokin IL-10 konnte zu den Zeitpunkten 0 h und 24 h nur zu sehr geringen Konzentrationen ohne signifikante Unterschiede gemessen werden (Abbildung 6 C). Ab 48 h und 72 h stieg die aus *E. coli* mpk-stimulierten Zellen (Wildtyp) sezernierte IL-10-Menge deutlich an und zeigte signifikante Unterschiede zur Menge aus unstimulierten und *B. vulgatus* mpk-stimulierten Zellen. Dabei wurden Höchstkonzentrationen von 640 pg/ml bis 1200 pg/ml in

*E. coli* mpk-Proben ermittelt. Dagegen verursachte die Stimulation der B-Zellen mit *B. vulgatus* mpk zu keinem Zeitpunkt eine signifikant veränderte IL-10-Sekretion verglichen mit der unstimulierten Negativkontrolle. Erneut waren auch hier signifikant geringere IL-10-Mengen bei den *E. coli* mpk-stimulierten Knockout-Kontrollen gegenüber den *E. coli* mpk-stimulierten Wildtyp-Zellen bei 48 h und 72 h messbar. Zuvor waren keine Unterschiede erkennbar.

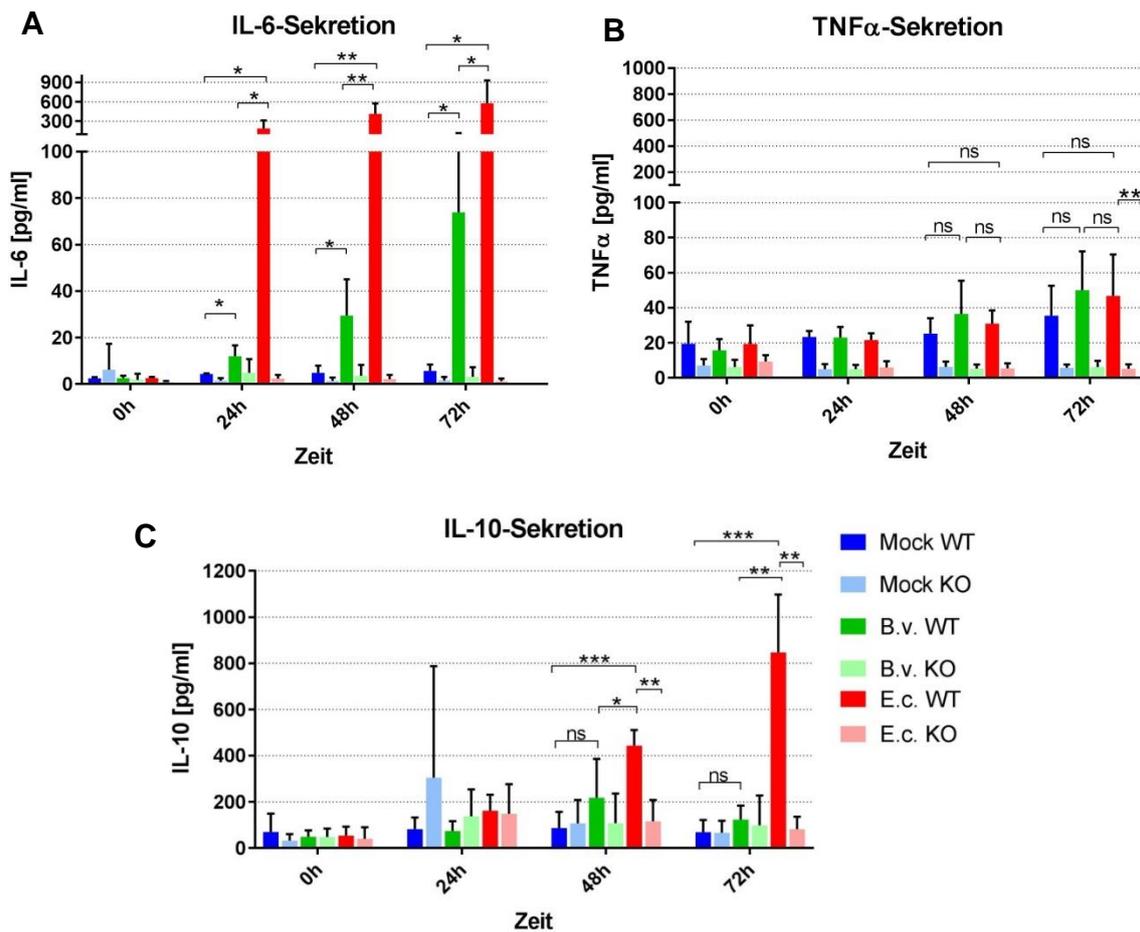


Abbildung 6: Interleukin-10 und -6 werden gesteigert von *E. coli* mpk-stimulierten B-Zellen sezerniert.

Die Schaubilder A-C zeigen die jeweilige Zytokinkonzentration zu den gemessenen Zeitpunkten (IL = Interleukin, TNF = Tumornekrosefaktor). Die Konzentrationen wurden photometrisch mittels *Enzym linked immunosorbent assay* (ELISA) ermittelt. Die Proben wurden aus dem Überstand der Zellkulturen stimulierter B-Zellen gewonnen und zu den jeweiligen Zeitpunkten, ca. 4 h nach Zugabe eines Leukozytenaktivierungscocktails (LAC), abgenommen. Die Stimulation mit den Bakterien *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk erfolgte mit einer MOI von 1, d.h. gleichem Zellverhältnis von Bakterien und B-Zellen. Direkt im Anschluss wurde Gentamycin zugegeben, um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Die naiven B-Zellen wurden aus der Milz von Wildtyp- und TLR2/TLR4-Knockout-Mäusen isoliert.

A zeigt die Konzentrationen von Interleukin-6 (IL-6) in pg/ml. B und C zeigen die Ergebnisse für den Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) respektive Interleukin-10.

Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit einem T-Test und bei fehlender Normalverteilung mit einem Mann-Whitney-Test ermittelt. Die Balken zeigen den Mittelwert der Replikate ( $n = 4$ ) mit Standardabweichung. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , ns = nicht signifikant  
 Stimuli: Mock = unstimulierte Kontrolle, *B. v.* = *Bacteroides vulgatus*, *E. c.* = *Escherichia coli*  
 Genotypen: WT = Wildtyp, KO = Toll-Like-Rezeptor-2/4-Knockout

A, B und C wurden publiziert in (Maerz et al., 2020).

### 3.2 Die Expression regulatorischer Marker wird durch *E. coli* mpk gesteigert

Unabhängig von den spezifischen Phänotypen der schon bekannten B<sub>reg</sub>-Subtypen, haben wir die Expression verschiedener Oberflächenmarker und intrazellulärer Proteine mit regulatorischem Potenzial untersucht. Dieses Experiment stellt eine Überprüfung und Erweiterung des vorherigen Versuchs dar. Die Fragestellung war, wie sich die Expressionsstärke der Oberflächenmarker durch die bakterielle Stimulation der Lymphozyten verändert. Hypothetisch bewirkt *E. coli* mpk eine vermehrte Expression dieser ausgewählten Marker, um ein Gegengewicht zu seinen pro-inflammatorischen Effekten zu schaffen. Beispielsweise kann von B-Zellen produziertes IL-10 autokrin auf die Lymphozyten rückwirken, was über den IL-10-Rezeptor vermittelt wird (Heine et al., 2014).

Aus der mittels Durchflusszytometrie erfassten Gesamtpopulation an Zellen wurden die B-Zellen über den Marker CD19 identifiziert (Abbildung 7 A). Aus diesen Zellen wurden nun die prozentualen Anteile der Zellen ermittelt, die den jeweils zu betrachtenden Marker tragen.

Die Abbildung 7 B – E und Abbildung 8 zeigen, dass zu Beginn der Stimulation bei 0 h alle Proteine in relativ geringer Expression von ca. 1-2 % (CD73, *Ebi3*, FasL, GitrL, IL-10-Rezeptor und Tim-1) oder schon mit etwas höherer Basalexpression von ca. 20 % (PD-1-L) vorliegen. Außerdem hat die unterschiedliche Stimulation hier noch keinerlei Effekt.

Die Expression des Enzyms CD73 ist bereits 24 h nach Stimulation mit *E. coli* mpk signifikant gegenüber Mock und *B. vulgatus* mpk-Stimulation erhöht und erreicht nach 48 h eine maximale Ausprägung auf durchschnittlich 13 % aller B-Zellen (Abbildung 7 B). Ein nahezu identisches Verhalten zeigen die Marker Fas-Ligand (FasL) in Abbildung 7 D, GitrL (*glucocorticoid-induced-tumor-necrosis-factor-related-receptor ligand*) in Abbildung 7 E und der Programmed-death-1-Ligand (PD-1-L) in Abbildung 7 C, letzterer aber mit insgesamt deutlich höheren Prozentwerten. Hier liegt die Grundexpression schon zu Beginn bei knapp 20 % und steigt durch *E. coli* mpk-Stimulation auf

über 60 % an. In allen vier Fällen zeigt allerdings auch die *B. vulgatus* mpk-Stimulation nach 72 h einen signifikanten Effekt.

Die Expression von *Ebi3* (*Epstein-Barr virus-induced gene 3*), einer Untereinheit des anti-inflammatorischen Zytokins IL-35, ist erst nach 48 h *E. coli* mpk-Stimulation mit etwa 17 % signifikant erhöht gegenüber den anderen Stimuli (Abbildung 8 B). Die unbehandelten und *B. vulgatus* mpk-stimulierten B-Zellen zeigen über die gesamte Zeitreihe hin keine signifikanten Unterschiede.

Die Basalexpression des IL-10-Rezeptors und des *T cell immunoglobulin and mucin domain protein 1* (Tim-1) liegt zu Beginn des Experiments bei 1 – 3 %, unabhängig vom Stimulus (vgl. Abbildung 8 A und C). Nach 24 h ist diese Expression der zwei Marker zwar erkennbar angestiegen, zeigt aber immer noch keine Stimulus-abhängigen Unterschiede. 48 h nach Beginn der Stimulation sind bei *E. coli* mpk-stimulierten B-Zellen allerdings mit ca. 20 % plötzlich signifikant höhere Anteile IL-10R- und Tim-1-exprimierender Zellen sichtbar.

Nach 72 h *E. coli* mpk-Stimulation sinkt dieser Anteil bei einigen der gemessenen Moleküle wieder; so zu sehen in Abbildung 7 B, D, E sowie Abbildung 8 A und B.

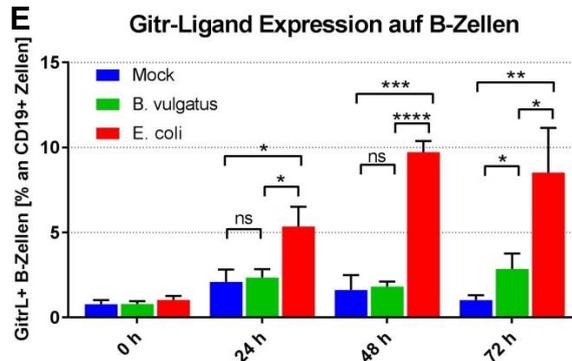
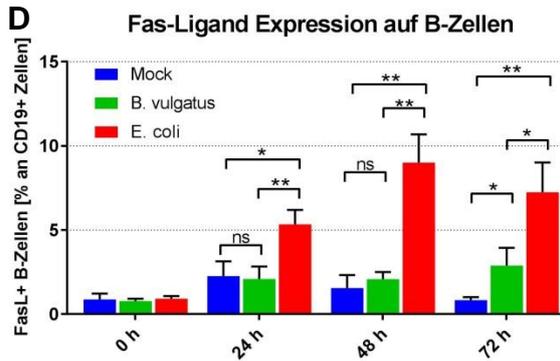
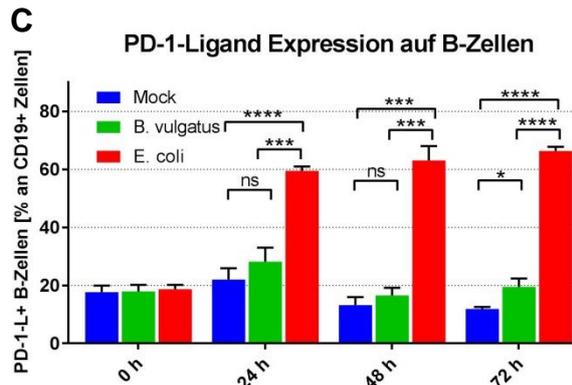
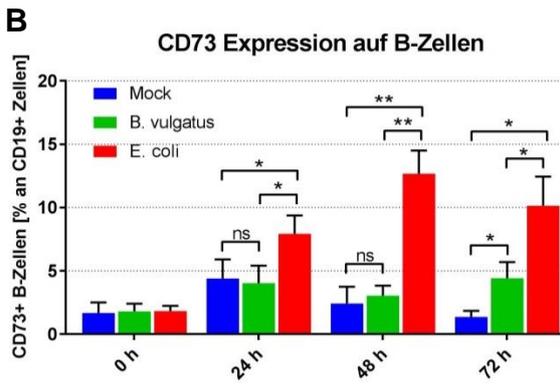
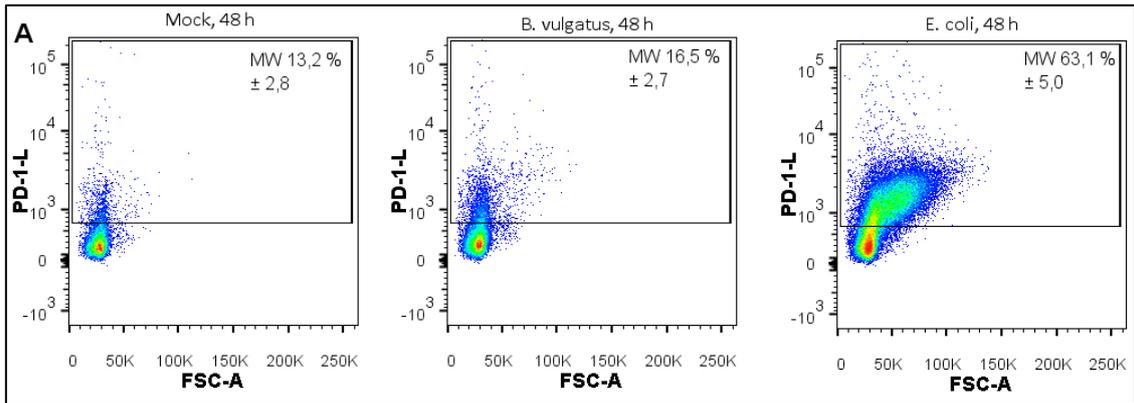


Abbildung 7. *E. coli mpk* induziert eine erhöhte Expression von CD73, PD-1-L, Fas-L und Gitr-L bereits nach 24 h.

B-Zellen wurden aus Wildtyp-Mäusen isoliert, mit *E. coli mpk* (MOI=1), *B. vulgatus mpk* (MOI=1) bzw. nicht stimuliert (Mock = Negativkontrolle) und für 0 bis 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann erfolgten eine Fixierung mit 4 % PFA und eine Färbung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern. Ziel des Experiments war die Beobachtung der Expression regulatorischer Marker nach Stimulation mit Symbionten und Pathobionten. A – D wurden publiziert in (Maerz et al., 2020).

Dargestellt sind in A die Dotplots exemplarischer Proben, die die Expression des Fas-Liganden zeigen. Dabei sind die Mittelwerte der prozentualen Anteile an allen B-Zellen mit Standardabweichung angegeben. B – E zeigen den prozentualen Anteil an allen B-Zellen, die den jeweiligen Marker exprimieren.

Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit einem T-Test und bei fehlender Normalverteilung mit einem Mann-Whitney-Test ermittelt. Die Messwerte der Zellen einer Maus wurden in dieser Statistik nicht berücksichtigt, da die Zellen schon zum Zeitpunkt 0 h zu über 50 % tot waren (andere Replikate nur < 3 % tote Zellen) und daher auch keinerlei Differenzierungsverhalten zeigen konnten. Die Balken zeigen den Mittelwert der Replikate (n = 3) mit Standardabweichung. \* p <= 0,05; \*\* p <= 0,01; \*\*\* p <= 0,001; \*\*\*\* p <= 0,0001, ns = nicht signifikant

Stimuli: Mock = unbehandelte Kontrolle, *B. v.* = *Bacteroides vulgatus*, *E. c.* = *Escherichia coli*

CD = Cluster of Differentiation, Fas = first apoptosis signal, Gitr = glucocorticoid-induced TNFR-related protein, MW = Mittelwert, PD-1 = programmed cell death protein 1

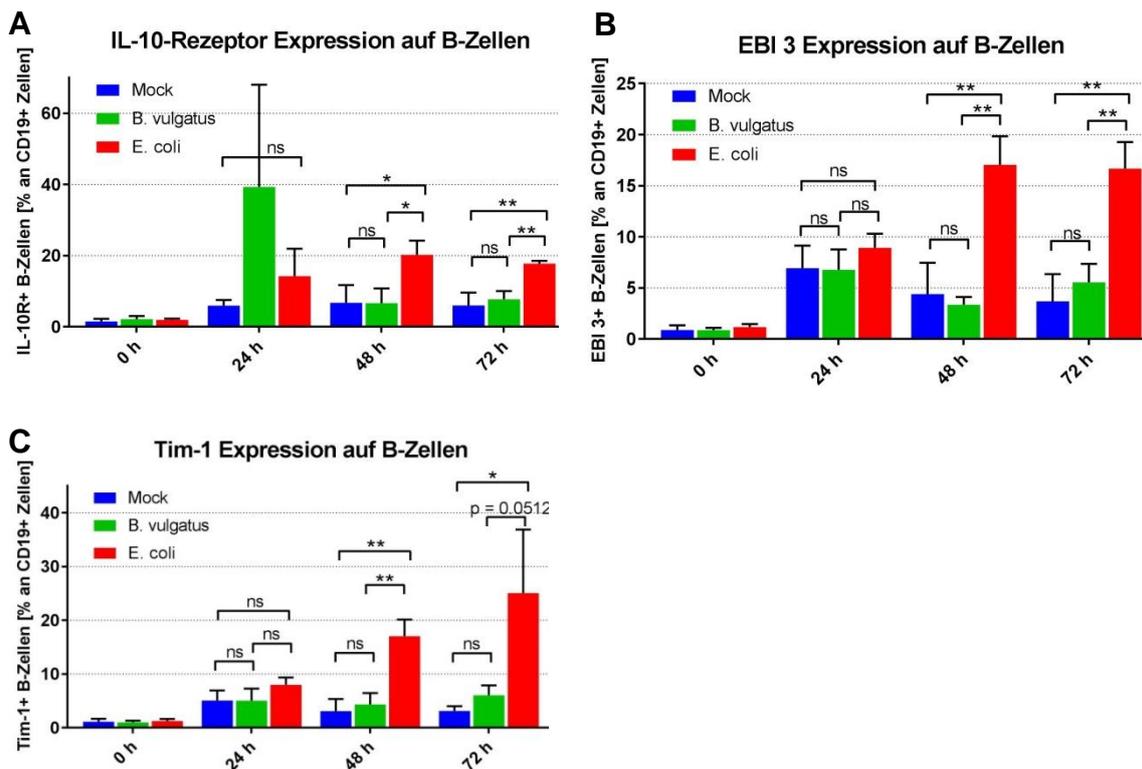


Abbildung 8. *E. coli* mpk-stimulierte B-Zellen zeigen ab 48 h Stimulation erhöhte Expressionen von IL-10R, Ebi3, und Tim-1.

B-Zellen wurden aus Wildtyp-Mäusen isoliert, MOI 1 mit *E. coli* mpk, *B. vulgatus* mpk bzw. nicht stimuliert (Mock = Negativkontrolle) und für 0 bis 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann erfolgten eine Fixierung mit 4% PFA und eine Färbung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern. Ziel des Experiments war die Beobachtung der Expression regulatorischer Marker nach Stimulation mit Symbionten und Pathobionten.

A – C zeigen den prozentualen Anteil an allen B-Zellen, die den jeweiligen Marker exprimieren.

Die Statistik wurde bei Normalverteilung mit einem T-Test und bei fehlender Normalverteilung mit einem Mann-Whitney-Test ermittelt. Die Messwerte der Zellen einer Maus wurden in dieser Statistik nicht berücksichtigt, da die Zellen schon zum Zeitpunkt 0 h zu über 50 % tot waren (andere Replikate nur < 3 % tote Zellen) und daher auch keinerlei Differenzierungsverhalten zeigen konnten. Die Balken zeigen den Mittelwert der Replikate (n = 3) mit Standardabweichung. \* p <= 0,05; \*\* p <= 0,01; \*\*\* p <= 0,001; \*\*\*\* p <= 0,0001, ns = nicht signifikant

Stimuli: Mock = unbehandelte Kontrolle, *B. v.* = *Bacteroides vulgatus*, *E. c.* = *Escherichia coli*

CD = Cluster of Differentiation, IL = Interleukin, EBI = Epstein-Barr virus induced gene, MOI = multiplicity of infection, Tim-1 = T cell immunoglobulin and mucin domain protein 1

A und B wurden leicht angepasst publiziert in (Maerz et al., 2020).

### **3.3 Regulatorische B-Zellen inhibieren T-Zell-Proliferation und fördern eine anti-inflammatorische Polarisierung**

Dieses Experiment diente zur Untersuchung der B<sub>reg</sub>-Effekte auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus OT-II-Mäusen. Dazu wurden zunächst Wildtyp-B-Zellen isoliert, mit *E. coli* mpk und *B. vulgatus* mpk stimuliert und mit einem OVA-Peptid inkubiert. Dies sollte später auf MHC-II-Molekülen der B-Zellen in ihrer antigenpräsentierenden Funktion erscheinen und eine Interaktion mit den transgenen, auf OVA spezialisierten T-Zellen ermöglichen. Außerdem wurden unterschiedliche Zell-Verhältnisse von B- zu T-zellen angesetzt, um eine mögliche Dosisabhängigkeit der zu beobachtenden Effekte feststellen zu können. Die Co-Kultur der beiden Lymphozyten wurde nach 72 h beendet.

#### **3.3.1 B<sub>reg</sub>-vermittelte Inhibition der T-Zell-Proliferation**

Zur Proliferationsanalyse wurden *carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE)-markierte T-Zellen im Durchflusszytometer gemessen. In Abbildung 9 E ist das CFSE-Signal in einem Histogramm aufgetragen und zeigt bei der unstimulierten Probe zwei deutliche Peaks. Der Peak der niedrigeren Signalstärke wird bei T-Zellen, die Kontakt zu *B. vulgatus* mpk-stimulierten B-Zellen hatten, geringer und verschwindet bei dem *E. coli* mpk- und *E. coli* mpk + Anti-IL-10-Ansatz fast ganz.

Die gleiche Tendenz zeigt sich in Abbildung 9 F, in der alle biologischen Replikate zu Mittelwerten zusammengefasst und nach Ansätzen und Zellverhältnissen getrennt aufgeführt sind. Hier ist allerdings nur der proliferierende Anteil (also der kleinere Peak) aller T-Zellen in Prozent dargestellt. In unbehandelten Ansätzen proliferieren zwischen 30 und 43 % der T-Zellen. *B. vulgatus* mpk-stimulierte B-Zellen zeigen in der 1:1-Co-Kultur noch keine Effekte, hemmen aber in fünffach und zehnfach höherer Konzentration signifikant die T-Zell-Proliferation. *E. coli* mpk-vorbehandelte B-Zellen zeigen diese inhibitorische Wirkung schon im äquivalenten Verhältnis zu den T-Zellen und vermindern den proliferierenden T-Zell-Anteil signifikant auf 20 %. Mit

steigender *E. coli* mpk-B-Zell-Konzentration sinkt dieser Anteil sogar auf ca. 5-7 %.

Die Zugabe des Anti-IL-10-Antikörpers zeigt eine noch stärkere Hemmung der Proliferation, die sogar in jedem Zellverhältnis signifikant gegenüber der *E. coli* mpk-B-Zell-Hemmung ist.

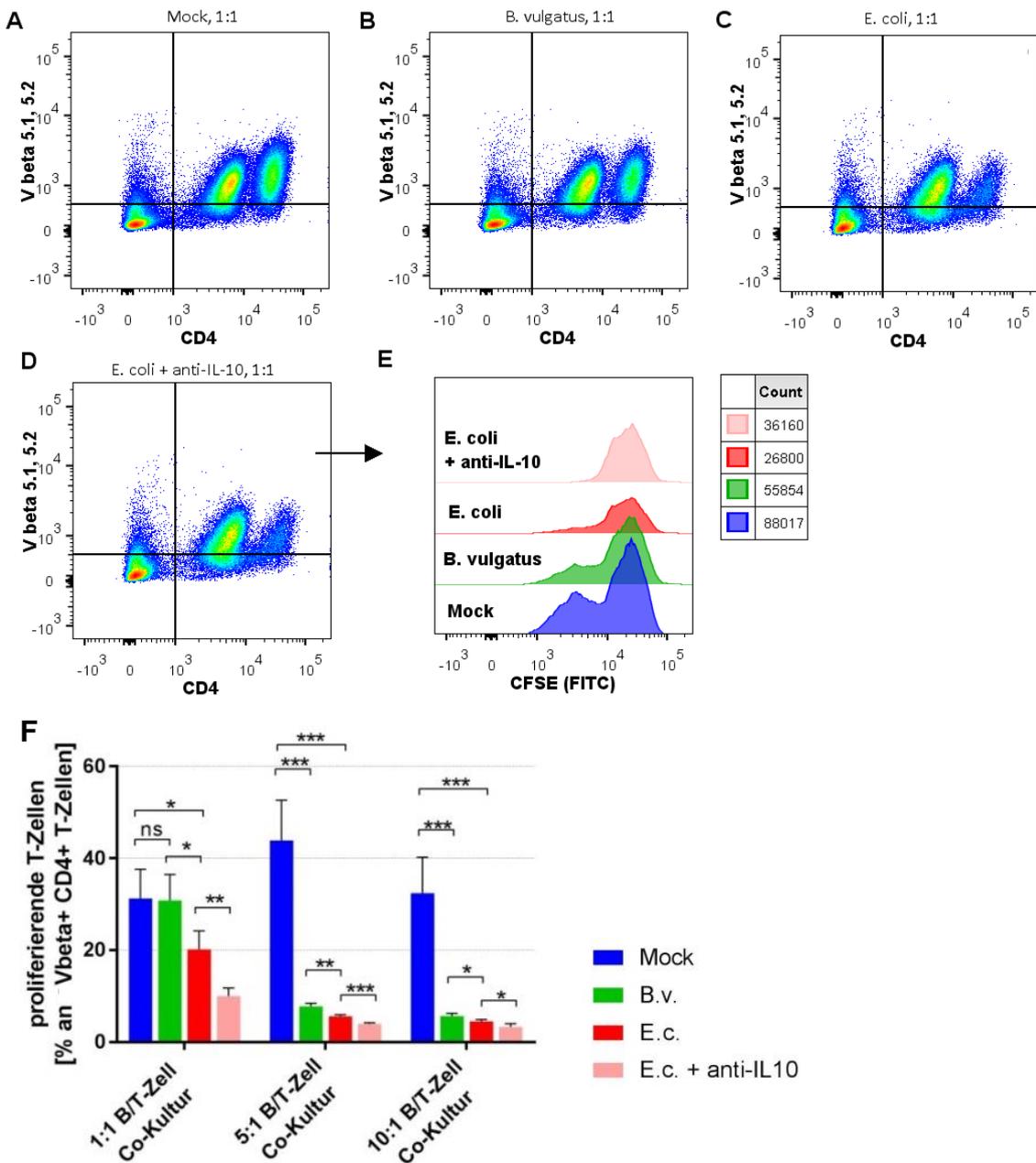


Abbildung 9. *B<sub>reg</sub>*-vermittelte Inhibition der T-Zell-Proliferation.

T-Zellen wurden aus OT-II transgenen Mäusen isoliert, mit *carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE) markiert und in verschiedenen Zell-Zell-Verhältnissen auf zuvor für 24 Stunden kultivierte und mit Bakterien (MOI 1) stimulierte B-Zellen gegeben. Nach Inkubation für 72 h wurden die Zellen mit Cytofix/Cytoperm fixiert, mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Dargestellt ist in A – D, jeweils im rechten oberen Quadranten die T-Zell-Population, die positiv für CD4 und die T-Zell-Rezeptor-Untereinheit V $\beta$  5.1/5.2 ist. Aus diesen Populationen wurden nun Histogramme für die Stärke des CFSE-Signals (E) generiert. In E wurden aus allen CD4 und V $\beta$  5.1/5.2 positiven Zellen (exemplarisch von einem Replikat) die Ergebnisse der vier Stimulationsansätze des gleichen biologischen Replikats in ein gemeinsames Schaubild integriert, um sie miteinander zu vergleichen. Die x-Achse des Histogramms zeigt dabei die Stärke des CFSE-Signals. In F werden die prozentualen Anteile proliferierender T-Zellen an allen CD4<sup>+</sup> und V $\beta$  5.1/5.2<sup>+</sup> Zellen aufgetragen. Die blauen Balken zeigen die T-Zellen, die Kontakt zu unstimulierten B-Zellen hatten, die grünen Balken, diejenigen T-Zellen, die von *Bacteroides vulgatus* (*B. v.*) stimulierten B-Zellen aktiviert wurden und die roten Werte die T-Zellen nach

Kontakt zu *Escherichia coli* (*E. c.*-)vorbehandelten B-Zellen. Im vierten Ansatz (rosa) wurde zu der *E. coli* mpk-Stimulation der B-Zellen noch Anti-IL-10-Antikörper zugegeben. Die Statistik wurde mittels T-Test (bzw. Mann-Whitney-Test bei fehlender Normalverteilung) erstellt. Dargestellt ist der Mittelwert aller biologischen Replikate ( $n = 4$ ) mit Standardabweichung als Fehlerbalken. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , ns = nicht signifikant  
CD = *Cluster of Differentiation*, Mock = unbehandelte Kontrolle, MOI = *multiplicity of infection*

### 3.3.2 *E. coli mpk* inhibiert Ausbildung des Th1-Phänotyps

Auch die Differenzierung der T-Zellen wurde durch Kontakt mit stimulierten B-Zellen beeinflusst. Dabei wurden in der Analyse drei Phänotypen herausgestellt: T-Helferzellen Typ 1 (Th1) werden über  $V\beta^+ CD4^+ IFN-\gamma^+$  charakterisiert; T-Helferzellen Typ 2 (Th2) über  $V\beta^+ CD4^+ IL4^+$  und T-Helferzellen Typ 17 (Th17) durch  $V\beta^+ CD4^+ IL17A^+ IL4^- IFN-\gamma^-$ . Durch *E. coli* mpk-Stimulation bewirken die B-Zellen eine signifikant größere Entwicklung von Th2-Zellen (Abbildung 10 G), sowohl in einem Verhältnis von 1:1 als auch 10:1 B- zu T-Zellen, verglichen mit einer fehlenden oder einer *B. vulgatus* mpk-Stimulation. Dagegen wird die Polarisation zu T-Helferzellen Typ 1 von *E. coli* mpk-stimulierten B-Zellen signifikant unterbunden, sobald ein Zell-Verhältnis von 10:1 bestand (Abbildung 10 A). Insgesamt ist der Anteil von Th1-Zellen in der 1:1 B-Zell-T-Zell-Co-Kultur allerdings bei allen Stimuli deutlich höher als in T-Zell-Monokulturen.

Auch der Th17-Phänotyp tritt in *E. coli* mpk-stimulierten 1:1 und 10:1 Co-Kulturen mit 7-9 % signifikant häufiger auf als in unstimulierten Proben. Des Weiteren ist der gesamte Th17-Anteil in allen Co-Kulturen doppelt so hoch wie in der Monokultur.

*B. vulgatus* mpk-stimulierte B-Zellen zeigen in den 10:1-Kulturen für alle drei Polarisationen die gleichen Effekte wie die *E. coli* mpk-stimulierten B-Zellen. Allerdings sind die Tendenzen deutlich schwächer ausgeprägt. In den 1:1-Kulturen ist kein signifikanter Unterschied zu den unstimulierten Negativkontrollen zu erkennen.

Anti-IL-10-Antikörper in *E. coli* mpk-stimulierten Proben scheinen sich ebenfalls auf die Polarisation auszuwirken und zumindest in den 10:1-Kulturen den Anteil an Th2-Zellen gegenüber der *E. coli* mpk-Probe, ohne den Antikörper zu verringern. Der Th17-Anteil wird dagegen erhöht.

Es wurde außerdem die  $T_{reg}$ -Population mit dem Phänotyp  $V\beta^+ CD4^+ Foxp3^+$  untersucht. Allerdings ergaben sich hier keinerlei signifikante Ergebnisse.

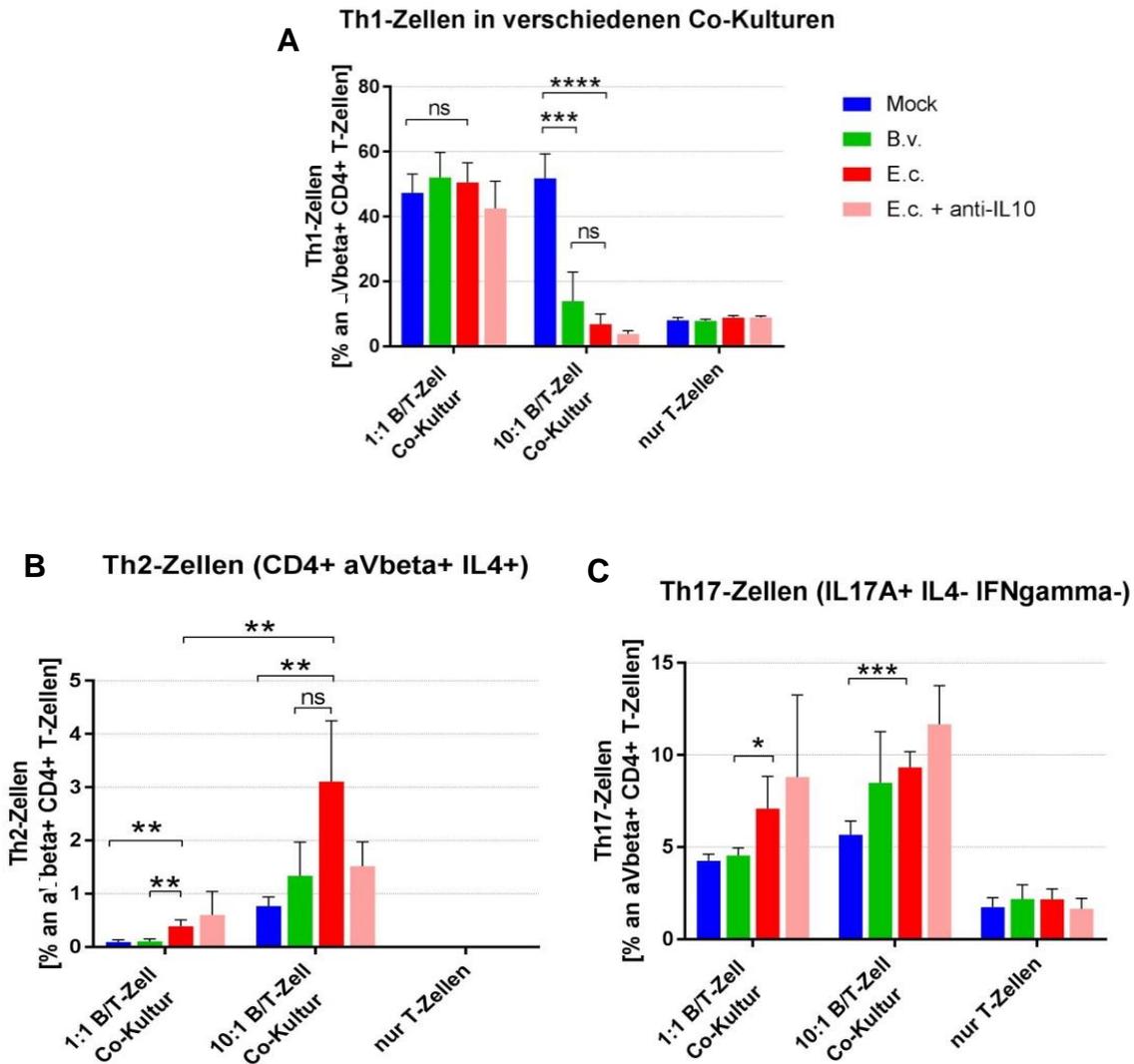


Abbildung 10. *E. coli* mpk-stimulierte B-Zellen fördern die Entwicklung eines anti-inflammatorischen T-Zell-Phänotyps.

T-Zellen wurden aus OT-II transgenen Mäusen isoliert und in verschiedenen Zell-Zell-Verhältnissen auf zuvor für 24 Stunden kultivierte und mit Bakterien (MOI 1) stimulierte B-Zellen gegeben (ohne CFSE-Labeling). Nach Inkubation für 72 h wurden die Zellen mit Cytofix/Cytoperm fixiert, mit Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Mittels FlowJo-Gating wurden zunächst die Dubletten entfernt und anschließend aus allen  $V\beta^+$   $CD4^+$  Zellen die in A, B und C gezeigten Phänotypen identifiziert. In A bis C sind die Mittelwerte der prozentualen Anteile der T-Helferzellen Typ 1 (A), T-Helferzellen Typ 2 (B) und T-Helferzellen Typ 17 (C) unterschieden nach Stimulus und Kulturform abgebildet. T-Helferzellen Typ 1 (Th1) werden über  $V\beta^+$   $CD4^+$   $IFN-\gamma^+$  charakterisiert.

Die Statistik wurde mittels T-Test (bzw. Mann-Whitney-Test bei fehlender Normalverteilung) erstellt. Dargestellt ist der Mittelwert aller biologischen Replikate ( $n = 4$ ) mit Standardabweichung als Fehlerbalken.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , ns = nicht signifikant

CD = Cluster of Differentiation, IFN = Interferon, Mock = unbehandelte Kontrolle, MOI = multiplicity of infection, FSC-A = Forward Scatter Area, FSC-H = Forward Scatter Height, SSC-A = Side Scatter Area

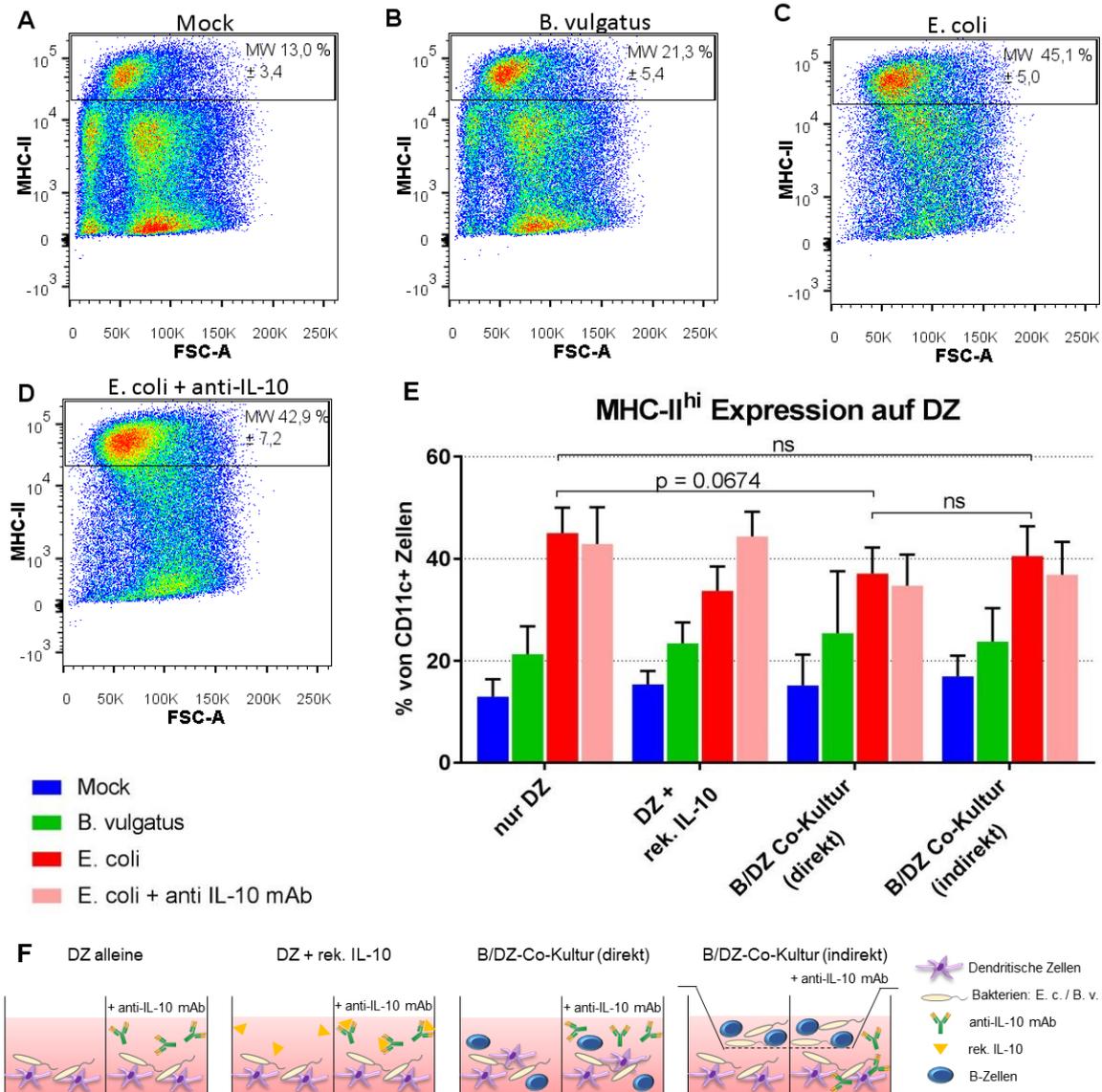
### 3.4 Transwell-Co-Kultur mit B-Zellen mindert Maturation dendritischer Zellen

In diesem Experiment wurden die Effekte stimulierter B-Zellen auf die Reifung, ebenfalls mit Bakterien inkubierter dendritischer Zellen untersucht. Durch den Einsatz der Transwells im Vergleich zu einfachen 12-Well-Platten sollte außerdem der Einfluss rein indirekter Zellkommunikation dem Einfluss des direkten Zell-Zell-Kontakts gegenübergestellt werden. In den Transwells verhinderte eine Membran den direkten Kontakt der Zellen in der oberen Kammer mit denen in der unteren Kammer. Lösliche Stoffe konnten allerdings ungehindert passieren.

Aus Wildtyp C57BL/6NCrI-Mäusen wurden dendritische Zellen und B-Zellen isoliert und in 12-Well-Platten ausgesät. Dabei wurden Monokulturen als Kontrollen und Co-Kulturen mit und ohne Transwells angelegt. Stimuliert wurde mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk, sowie *E. coli* mpk + Anti-IL-10. Letzteres sollte IL-10 neutralisieren und so die Abhängigkeit der Effekte von diesem Zytokin zeigen. Ein Ansatz mit rekombinantem IL-10 in allen Stimulationsformen stellte die Positivkontrolle dar. Die für die Auswertung entscheidenden Versuchsansätze sind in Abbildung 11 F schematisch dargestellt. Dabei wurden die B-Zellen erstmals nach ihrer Isolation und Aussaat vorstimuliert sowie 24 h später erneut gemeinsam mit den dendritischen Zellen in der Co-Kultur. Nach 24 h gemeinsamer Kultur wurde bei den dendritischen Zellen die Maturation mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die B-Zellen wurden dahingehend untersucht, ob nach *E. coli* mpk-Stimulation signifikant mehr B10-Zellen gebildet wurden, wie es auch schon in den vorangegangenen Versuchen der Fall war.

In Abbildung 11 A bis D ist mittels Dotplots dargestellt, wie sich die Zellen nach ihrer MHC-II-Expression in der Durchflusszytometrie verteilen. Das Beispiel zeigt unterschiedlich stimulierte Proben aus der DZ-Monokultur eines biologischen Replikats. Schaubild E zeigt daraufhin die Mittelwerte der prozentualen Anteile aller biologischen Replikate derjenigen dendritischen Zellen mit hoher MHC-II-Expression. Dabei fällt zunächst auf, dass die MHC-II-Expression bei den unbehandelten Proben am geringsten ist und sich abhängig von der Kulturform nicht verändert. Die *B. vulgatus* mpk-Stimulation erzeugt eine leicht erhöhte prozentuale Zellzahl mit hoher MHC-II-Expression, aber

auch diese Tatsache bleibt von der Kulturform unbeeinflusst. *E. coli* mpk-stimulierte Proben zeigen tendenziell die höchste Rate an MHC-II<sup>hi</sup> positiven dendritischen Zellen. Allerdings ist die MHC-II<sup>hi</sup>-Expression in der Co-Kultur mit direktem Zellkontakt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 6,7 % geringer als in der DZ-Monokultur. Der Unterschied zur Co-Kultur ohne direkten Zell-Zell-Kontakt ist nicht signifikant. Die Zugabe von rekombinantem IL-10 zu dendritischen Zellen bewirkte eine Verringerung der MHC-II<sup>hi</sup> –Expression auf *E. coli* mpk-stimulierten DZ. Dieser Effekt wird sichtbar durch Anti-IL-10-Antikörper aufgehoben. Ohne rekombinantes IL-10 zeigt die Anti-IL-10-Gabe allerdings keine signifikanten Unterschiede zu den *E. coli* mpk-Proben ohne diesen Zusatz.



**Abbildung 11. Direkte B-Zell-DZ-Co-Kultur zeigt Tendenz zu Inhibition der MHC-II Expression auf DZ.** Knochenmarksgereifte dendritische Zellen (KGDZs) wurden aus dem Knochenmark von Wildtypmäusen isoliert und sieben Tage bei 37°C kultiviert. Dabei wurde mit GM-CSF eine Differenzierung zu immaturren dendritischen Zellen bewirkt. Anschließend wurden sie in verschiedenen Ansätzen in neue Monokulturen oder in Co-Kultur mit schon 24 h stimulierten B-Zellen (ebenfalls Wildtyp) gegeben und mit Mock (Negativkontrolle), *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk bzw. *E. coli* mpk + Anti-IL-10-Antikörper stimuliert (MOI 1). Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, fixiert und einer Färbung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern unterzogen, bevor sie mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden. F zeigt die Versuchsansätze schematisch (modifiziert aus Maerz et al., 2020). In A bis D ist die Verteilung MHC-II-exprimierender Zellen beispielhaft anhand unterschiedlich-stimulierter Proben aus DZ-Monokulturen aufgezeigt; Mittelwert und Standardabweichung sind angegeben. Die dendritischen Zellen wurden anhand des Markers CD11c (CD = *Cluster of Differentiation*) identifiziert und dann weiter auf MHC-II, CD40, CD80 und CD86 untersucht. Die Mittelwerte der prozentualen Anteile der CD11c-positiven Zellen, die MHC-II exprimieren sind in E nach Ansätzen getrennt dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test oder Mann-Whitney-Test (wenn keine Normalverteilung gegeben war). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb der biologischen Replikate (n = 4). ns = nicht signifikant

CD = *Cluster of Differentiation*, DZ = dendritische Zellen, FSC-A = *Forward Scatter Area*, FSC-H = *Forward Scatter Height*, GM-CSF = *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, IL = Interleukin, mAb = *monoclonal antibody*, MHC = *Major Histocompatibility Complex*, Mock = unbehandelte Kontrolle, MOI = *multiplicity of infection*, MW = Mittelwert, rek. = rekombinant, SSC-A = *Side Scatter Area*

In Abbildung 12 sind weitere Maturationsmarker aufgeführt. Das unter anderem für Zellaktivierung verantwortliche Protein CD40 aus der Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren ist in *E. coli* mpk-stimulierten Zellkulturen deutlich hochreguliert (vgl. Abbildung 12 A). Diese Beobachtung ist sogar noch stärker in allen *E. coli* mpk-stimulierten Proben mit Anti-IL-10-Antikörper wiederzufinden. Die Zugabe von rekombinantem IL-10 vermindert die CD40-Expression in *E. coli* mpk-stimulierten Proben deutlich gegenüber dem Äquivalent ohne diesen Zusatz. Die indirekte Inkubation der dendritischen Zellen mit vorstimulierten B-Zellen in Transwells zeigt eine signifikante Reduktion der CD40-Expression auf unter 10 % gegenüber der DZ-Monokultur (ca. 21 %) sowie im Vergleich mit der direkten Co-Kultur in 12-Wells (20 %).

Dendritische Zellen unstimulierter Kulturen zeigen unabhängig von der Co-Kultur eine CD40-Expression von ca. 1 – 3 %. Auch die *B. vulgatus* mpk-stimulierten Kulturen zeigen ähnliche Ergebnisse.

Die Auswertung der prozentualen Anteile für dendritische Zellen mit CD80-Expression zeigte in allen Aspekten ähnliche Tendenzen wie bei der CD40-Expression. Allerdings lagen hier die Prozenstränge insgesamt deutlich höher als bei der CD40-Expression.

Zur Beurteilung der CD86-Expression wurde die MFI herangezogen, da sich innerhalb der positiven Population zwei Subpopulationen unterschiedlich hoher Expression gebildet haben, zwischen deren Verteilung die MFI unterscheiden kann. Unstimulierte und *B. vulgatus* mpk-stimulierte Kulturen verhalten sich auch hier wie schon oben beschrieben und zeigen keine kulturabhängigen Unterschiede. Dafür vermindert sowohl die direkte Kultur mit *E. coli* mpk-stimulierten B-Zellen als auch die indirekte Co-Kultur signifikant die CD86-Expression auf dendritischen Zellen.

Prozentual war CD86 auf unstimulierten und *B. vulgatus* mpk-stimulierten DZ in Monokultur im Mittel zu ca. 75 % exprimiert, wohingegen in *E. coli* mpk-Proben ca. 90 % der DZ CD86 zeigten.

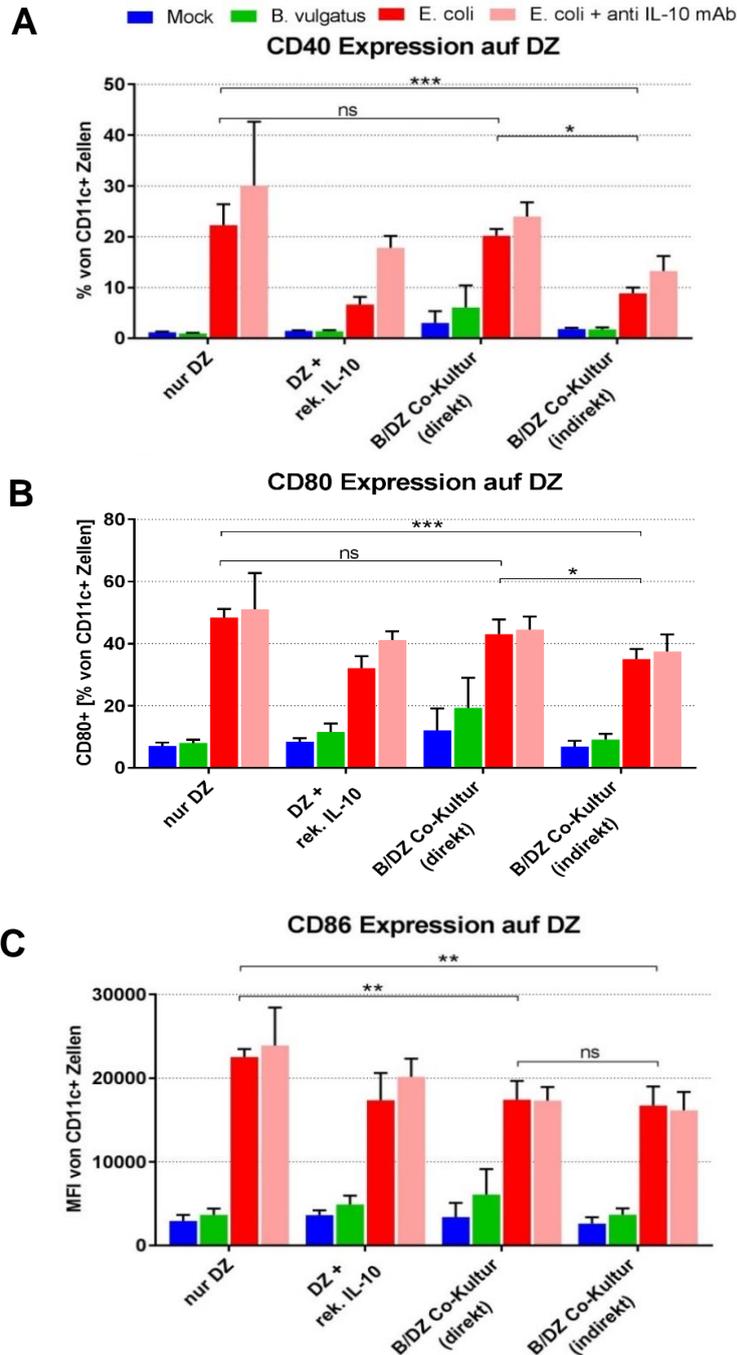


Abbildung 12. Transwell-Co-Kultur *E. coli* mpk-stimulierter B-Zellen mit DZ inhibiert Expression von Maturationsmarkern.

Knochenmarksgereifte dendritische Zellen (KGDZs) wurden aus dem Knochenmark von Wildtypmäusen isoliert und sieben Tage bei 37°C kultiviert. Dabei wurde mit GM-CSF eine Differenzierung zu immaturren dendritischen Zellen bewirkt. Anschließend wurden sie in verschiedenen Ansätzen in neue Monokultur oder in Co-Kultur mit schon 24 h stimulierten B-Zellen (ebenfalls Wildtyp) gegeben und mit Mock (Negativkontrolle), *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk bzw. *E. coli* mpk + Anti-IL-10-Antikörper stimuliert (MOI 1). Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, fixiert und einer Färbung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern unterzogen, bevor sie mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden. Die Mittelwerte der prozentualen Anteile der CD11c-positiven Zellen, die CD40 exprimieren, sind im Diagramm A nach Ansätzen getrennt dargestellt, diejenigen für CD80 (PerCP-Cy 5.5) in B. C zeigt die mittlere Intensität (= MFI) der Fluoreszenz für CD86 (PE-Cy 7).

Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test oder Mann-Whitney-Test (wenn keine Normalverteilung gegeben war). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb der biologischen Replikate (n = 4). \* p <= 0,05; \*\* p <= 0,01; \*\*\* p <= 0,001; \*\*\*\* p <= 0,0001, ns = nicht signifikant  
CD = *Cluster of Differentiation*, DZ = dendritische Zellen, FSC-A = *Forward Scatter Area*, GM-CSF = *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, mAb = *monoclonal antibody*, Mock = unbehandelte Kontrolle, MOI = *multiplicity of infection*, rek. = rekombinant

Die Analyse der Überstände der Zellkulturen – abgenommen unmittelbar vor der Zellfixierung – mit der ELISA-Methode ergab die Konzentrationen der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-10. In den jeweils 2 ml Medium befanden sich  $5 \times 10^6$  B-Zellen und/oder  $1 \times 10^6$  dendritische Zellen.

Unstimulierte und *B. vulgatus* mpk-stimulierte DZ sowie Monokulturen aus B-Zellen (unabhängig vom Stimulus) produzieren keine nennenswerten TNF- $\alpha$ -Mengen über 100 pg/ml (Abbildung 13 A). Dagegen werden in der DZ-Monokultur nach *E. coli* mpk-Stimulation ca. 1800 pg/ml TNF- $\alpha$  gemessen. Ist zusätzlich noch Anti-IL-10 im Medium, werden sogar Konzentrationen von etwa 3600 pg/ml erreicht. Die TNF- $\alpha$ -Menge der *E. coli* mpk-stimulierten DZ-Monokultur ist dabei statistisch signifikant größer als nach *E. coli* mpk-Stimulation der B-Zell/DZ-Co-Kultur mit direktem Zell-Zell-Kontakt (ca. 800 pg/ml). Dagegen besteht kein signifikanter Unterschied zum *E. coli* mpk-Ansatz der indirekten B-Zell/DZ-Co-Kultur im Transwell (ca. 1500 pg/ml). Die DZ-Monokultur mit rekombinantem Interleukin-10 zeigt stark verminderte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (< 100 pg/ml), was auch durch Anti-IL-10-Gabe nur minimal aufgehoben wird (ca. 500 pg/ml).

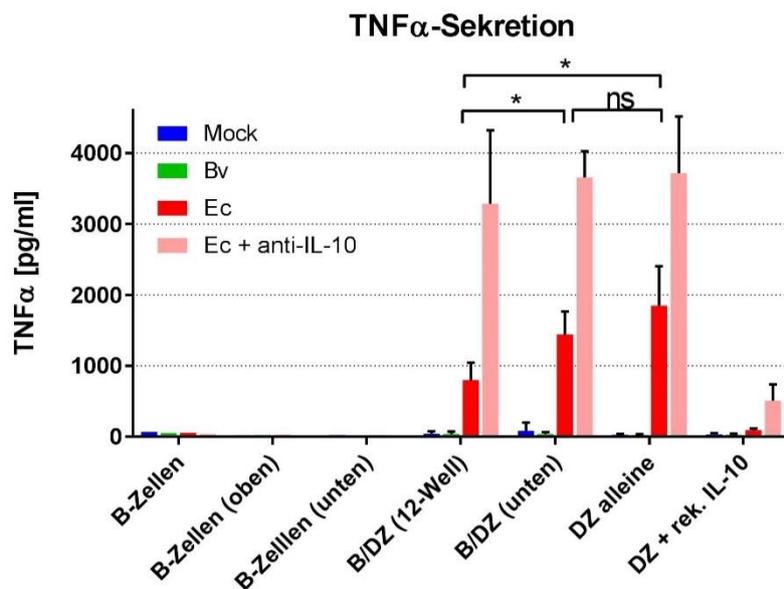
Genau gegenteilig verhalten sich die gemessenen Konzentrationen an IL-10 in den Überständen (Abbildung 13 B). Sowohl B-Zellen als auch DZ produzieren in Monokulturen nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk oder *E. coli* mpk IL-10-Mengen zwischen 200 und 500 pg/ml. Das rekombinante IL-10 wird mit Konzentrationen von 150 000 pg/ml gemessen und durch die Zugabe von Anti-IL-10 auf unter 50 000 pg/ml gesenkt.

In den B-Zell/DZ-Co-Kulturen bewirkt die *B. vulgatus* mpk-Stimulation überall IL-10-Konzentrationen von etwa 500 pg/ml. Nach *E. coli* mpk-Stimulation werden Werte von 2000 – 3000 pg/ml gemessen, die alle signifikant höher sind als der vergleichbare *E. coli* mpk-Ansatz in der DZ-Monokultur. Untereinander, also zwischen direkter und indirekter Kultur (auch obere und untere Kammer), bestehen keine signifikanten Konzentrationsunterschiede.

IL-1 $\beta$  wird ebenfalls nur in den B-Zell/DZ-Co-Kulturen und der DZ-Monokultur nach *E. coli* mpk-Stimulation mit Konzentrationen von 280 pg/ml nachgewiesen.

Wurden diese Ansätze zusätzlich mit Anti-IL-10 versetzt, ergeben sich Werte zwischen 1000 und 1300 pg/ml. Allerdings zeigen sich keinerlei signifikante Unterschiede zwischen diesen unterschiedlichen Kulturen. Alle B-Zell-Monokulturen produzieren deutlich unter 100 pg/ml IL-1 $\beta$ .

**A**



**B**

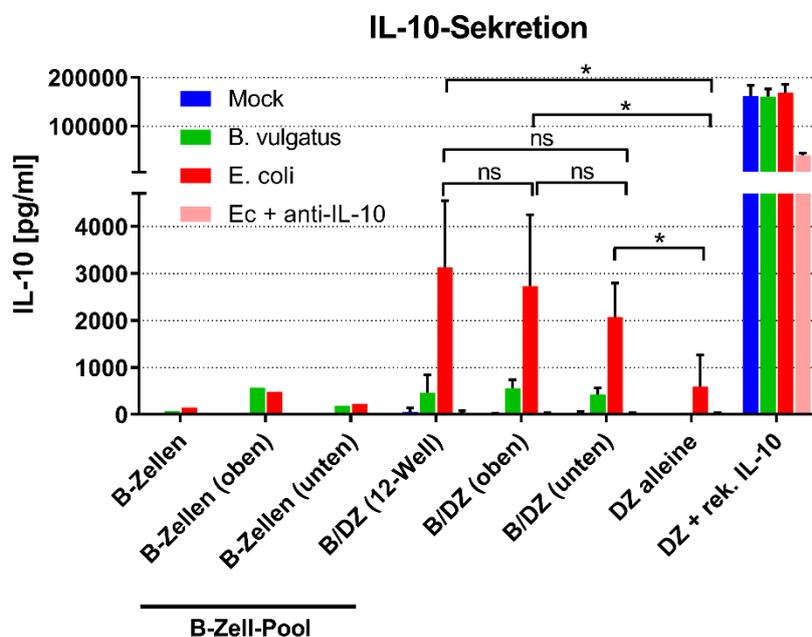


Abbildung 13. Die direkte B-Zell/DZ-Co-Kultur schafft ein anti-inflammatorisches Mikromilieu.

Knochenmarksgereifte dendritische Zellen (KGDZs) wurden aus dem Knochenmark von Wildtypmäusen isoliert und sieben Tage bei 37°C kultiviert. Dabei wurde mit GM-CSF eine Differenzierung zu immaturren dendritischen Zellen bewirkt. Anschließend wurden sie in verschiedenen Ansätzen in neue Monokultur oder in Co-Kultur mit schon 24 h stimulierten B-Zellen (ebenfalls Wildtyp) gegeben und mit Mock (Negativkontrolle), *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk bzw. *E. coli* mpk + Anti-IL-10-Antikörper stimuliert (MOI 1). Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und der Überstand bei -20°C weggefroren, bevor er mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) untersucht wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Zytokinkonzentrationen des Tumornekrosefaktors  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in A und von Interleukin-10 (IL-10) in B.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test oder Mann-Whitney-Test (wenn keine Normalverteilung gegeben war). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb der biologischen Replikate (n = 4). \* p  $\leq$  0,05; \*\* p  $\leq$  0,01; \*\*\* p  $\leq$  0,001; \*\*\*\* p  $\leq$  0,0001, ns = nicht signifikant

C = Konzentration, DZ = dendritische Zellen, GM-CSF = *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, mAb = *monoclonal antibody*, Mock = unbehandelte Kontrolle, MOI = *multiplicity of infection*, rek. = rekombinant

### 3.5 Dreifachkultur mit B- / T- und dendritischen Zellen

Als Kombination aus dem DZ-Maturationsversuch in Transwells und dem T-Zell-Proliferationsassay wurde hier eine Dreifachkultur mit DZ, B- und T-Zellen durchgeführt. Dafür wurden DZ über eine Woche aus dem Knochenmark von Wildtyp-Mäusen differenziert und naive B-Zellen aus der Milz isoliert. Am Tag der B-Zell-Isolation wurden diese auch mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk stimuliert, bevor sie am Folgetag mit ebenfalls stimulierten dendritischen Zellen in Co-Kultur gebracht wurden. Am nächsten Tag erfolgte die Isolation naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus OT-II-Mäusen und die teilweise CFSE-Markierung. Die DZ/B-Zell-Co-Kultur wurde 4 h vor Zugabe der T-Zellen mit OVA-Peptid inkubiert und anschließend mit frischem Medium versehen. Außerdem wurden verschiedene Mono- und Doppelkulturen mit und ohne OVA bzw. CFSE als Kontrollen zur Dreifachkultur angelegt. Analysiert wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie und der Kulturüberstand mittels ELISA.

Die durchflusszytometrischen Ergebnisse der B-Zell-Färbung zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der B-Zell-Monokultur und dem Äquivalent mit OVA. In beiden Kulturen konnten nach *E. coli* mpk-Stimulation 7 % regulatorische B10-Zellen (von allen CD19<sup>+</sup> Zellen) nachgewiesen werden und damit signifikant mehr als ohne Stimulation bzw. nach *B. vulgatus* mpk-Stimulation.

#### 3.5.1 *B<sub>regs</sub>* machen den Unterschied: Inhibition der Maturation dendritischer Zellen in der Dreifachkultur

Alle in Abbildung 14 dargestellten Proben wurden mit OVA inkubiert. Der Vergleich zu einer DZ-Monokultur ohne die OVA-Zugabe zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Deutlich erkennbar exprimieren in der DZ-Monokultur vor allem die *E. coli* mpk-stimulierten dendritischen Zellen die Maturationsmarker MHC-II<sup>hi</sup> (ca. 70 %), CD40 (ca. 82 %), CD80 (ca. 95 %) und CD86 (ca. 95 %). *B. vulgatus* mpk zeigt dagegen keinen Unterschied gegenüber unstimulierten Proben.

Die Rate an MHC-II<sup>hi</sup>-exprimierenden DZ ist in der DZ/T-Zell-Co-Kultur insgesamt deutlich erhöht – vor allem unstimulierte und *B. vulgatus* mpk

stimulierte Proben haben ihren Anteil gegenüber der DZ-Monokultur verdoppelt – wobei die *E. coli* mpk-stimulierte Probe keinen signifikanten Unterschied zur DZ/T-*B. vulgatus* mpk-Stimulation und zur DZ-*E. coli* mpk-Stimulation zeigt. In der Dreifachkultur allerdings ist der Anteil an dendritischen Zellen mit MHC-II<sup>hi</sup>-Expression signifikant niedriger als in der DZ-Monokultur oder der DZ/T-Zell-Co-Kultur sowie im Vergleich mit der *B. vulgatus* mpk-stimulierten Probe. Dafür zeigt die *B. vulgatus* mpk-Stimulation in der Dreifachkultur die höchste Expression an MHC-II<sup>hi</sup> mit rund 70 % der Zellen.

Sehr ähnliche Ergebnisse zeigen auch die drei anderen Marker, wobei die CD86-Expression schon unstimuliert und *B. vulgatus* mpk-stimuliert in der DZ-Monokultur mit rund 70 % relativ hoch ist. Außerdem sind die höhere CD40- und CD80-Expression der *E. coli* mpk-stimulierten DZ in der DZ/T-Co-Kultur signifikant gegenüber der *B. vulgatus* mpk-Stimulation unter gleichen Bedingungen.

Wie oben schon erwähnt ist der Anteil CD86 exprimierender dendritischer Zellen in allen Ansätzen sehr hoch und bei der *E. coli* mpk-stimulierten Monokultur nahe 100 %. Dieser Wert ist signifikant höher als das ebenfalls *E. coli* mpk-stimulierte Äquivalent in der DZ/T-Co-Kultur.

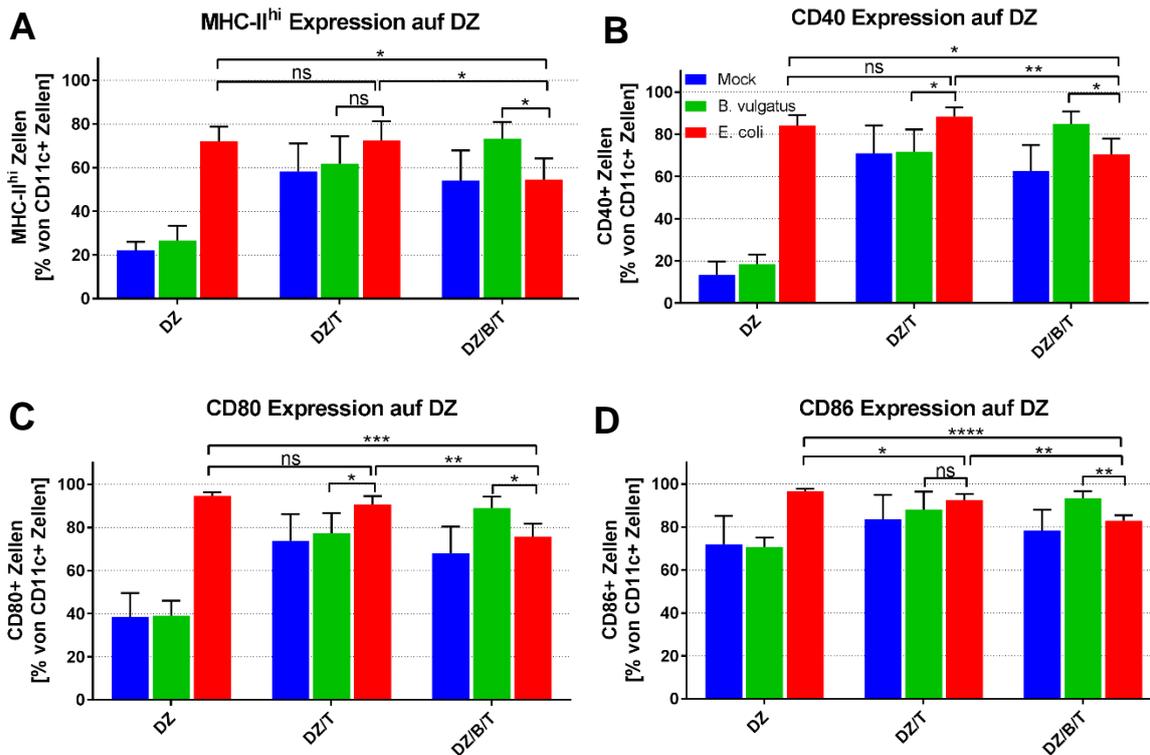


Abbildung 14. *B<sub>reg</sub>* in der Dreifachkultur inhibieren die DZ-Maturation.

Immature DZ wurden aus dem Knochenmark von Wildtyp-Mäusen differenziert und in Co-Kultur mit 24 h vorstimulierten Wildtyp-B-Zellen gebracht, bevor eine erneute Stimulation (MOI 1) erfolgte. Nach vierstündiger Inkubation mit OVA wurden CD4<sup>+</sup> naive OT-II-T-Zellen zur Co-Kultur gegeben und für 72 h kultiviert. Die Abbildung zeigt in A-D den prozentualen Anteil an dendritischen Zellen (DZ), die den jeweiligen Maturationsmarker exprimieren.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test oder Mann-Whitney-Test (wenn keine Normalverteilung gegeben war). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb der biologischen Replikate (n = 4). \* p <= 0,05; \*\* p <= 0,01; \*\*\* p <= 0,001; \*\*\*\* p <= 0,0001, ns = nicht signifikant

B = B-Zellen, CD = Cluster of Differentiation, DZ = dendritische Zellen, MHC = Major Histocompatibility Complex, Mock = unbehandelte Kontrolle, MOI = multiplicity of infection, T = T-Zellen

### 3.5.2 Ergebnisse der T-Zell-Analyse

Bei der T-Zell-Analyse wurde in Proliferations- und Polarisationsanalyse unterschieden. Für Erstere wurde wie schon im T-Zell-Proliferationsassay CFSE als intrazelluläre Markersubstanz verwendet, die bei jeder Zellteilung gleichmäßig verteilt wird und daher bezogen auf die einzelne Zelle kontinuierlich abnimmt. Für die Proliferationsanalyse wurden ausschließlich CFSE-markierte T-Zellen eingesetzt. Alle anderen Zellkulturen enthielten T-Zellen ohne CFSE-Markierung.

Aus den durchflusszytometrischen Ergebnissen der Proliferationsfärbung ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Einfach-, Zweifach- und Dreifachkulturen. In den CFSE-Histogrammen der FlowJo-Software sind oftmals zwei kleine Peaks erkennbar, die auf eine beginnende Proliferation hindeuten, allerdings ist auch die Mittelwert-Analyse nicht signifikant.

Dagegen können bei den T-Zell-Phänotypen folgende Tendenzen nachgewiesen werden: In der B-Zell/T-Zell-Co-Kultur gibt es zwar signifikant mehr Th1-Zellen  $V\beta^+$   $CD4^+$   $IFN-\gamma^+$  in *E. coli* mpk-stimulierten Proben als nach fehlender oder *B. vulgatus* mpk-Stimulation, allerdings ist dieser prozentuale Anteil gegenüber der Ausgangspopulation in T-Zell-Monokulturen nicht signifikant verändert (Abbildung 15 A). In der *E. coli* mpk-stimulierten DZ/T-Zell-Co-Kultur macht die Population der Th1-Zellen ca. 45 % aus, was signifikant mehr als im *B. vulgatus* mpk-stimulierten Ansatz (< 20 %) oder als im *E. coli* mpk-Ansatz (ca. 18 %) der B-Zell/T-Zell-Co-Kultur ist. In der Dreifachkultur zeigt der *B. vulgatus* mpk-stimulierte Ansatz mit 40 % den höchsten Th1-Anteil, wohingegen nach *E. coli* mpk-Stimulation mit ca. 36 % signifikant weniger Th1-Zellen vorliegen. Auch die Th1-Abnahme dieser Probe gegenüber der DZ/T-Zell-*E. coli* mpk-Probe ist signifikant.

Beim Vergleich der Th2-Populationen ( $V\beta^+$   $CD4^+$   $IL4^+$ ) innerhalb der unterschiedlichen Co-Kulturen ergibt sich ein gegenteiliger Trend (Abbildung 15 B): In der B-Zell/T-Zell-Co-Kultur bewirkt die *E. coli* mpk-Stimulation eine signifikant geringere Menge an Th2-Zellen gegenüber der unstimulierten T-Zell-

Monokultur und der unstimulierten B-Zell/T-Zell-Co-Kultur. In der DZ/T-Zell-Co-Kultur sind die Th2-Zellen mit ca. 1,2 % nach *E. coli* mpk-Stimulation am stärksten ausgeprägt und signifikant höher als nach *B. vulgatus* mpk-Stimulation oder *E. coli* mpk-Stimulation in der B-Zell/T-Zell-Co-Kultur. Die Dreifachkultur zeigt ähnliche Werte wie die DZ/T-Zell-Co-Kultur, wobei die *E. coli* mpk-stimulierte Probe nur signifikant höher als *E. coli* mpk-Th2-Zellen in der B-Zell/T-Zell-Co-Kultur, nicht aber höher als in der DZ/T-Zell-Co-Kultur ist. Allerdings müssen die Prozentzahlen hier in Anbetracht ihrer Größe bei der Interpretation vorsichtig verwendet werden.

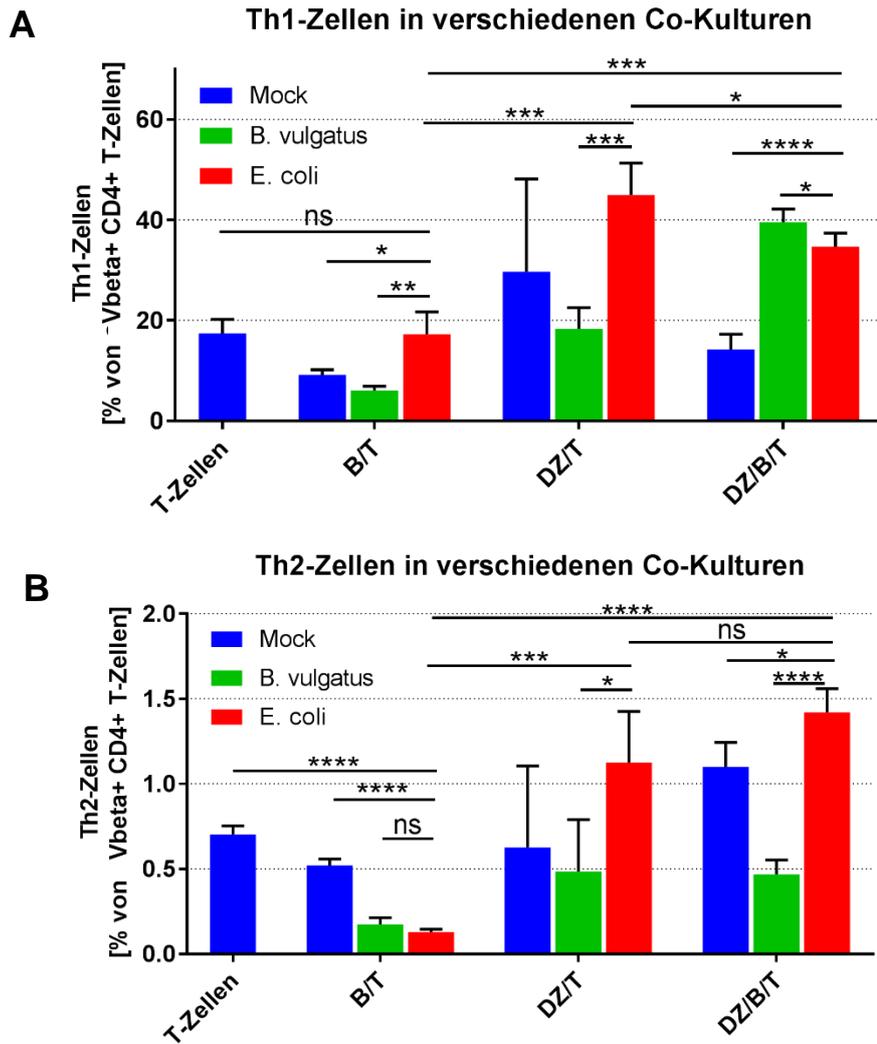


Abbildung 15. *E. coli mpk-stimulierte B-Zellen wirken dem Th1-förderndem Einfluss der E. coli mpk-stimulierten DZ entgegen.*

Immature DZ wurden aus dem Knochenmark von Wildtyp-Mäusen differenziert und in Co-Kultur mit 24 h vorstimulierten Wildtyp-B-Zellen gebracht, bevor eine erneute Stimulation (MOI 1) erfolgte. Nach vierstündiger Inkubation mit OVA wurden CD4<sup>+</sup> naive OT-II-T-Zellen zur Co-Kultur gegeben und für 72 h kultiviert. Die Abbildung zeigt in A den Anteil an T-Zellen mit dem Th1-Phänotyp (Vβ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup>) und in B den Anteil mit dem Th2-Phänotyp (Vβ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> IL4<sup>+</sup>).

Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test oder Mann-Whitney-Test (wenn keine Normalverteilung gegeben war). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb der biologischen Replikate (n = 4). \* p <= 0,05; \*\* p <= 0,01; \*\*\* p <= 0,001; \*\*\*\* p <= 0,0001, ns = nicht signifikant

B = B-Zellen, CD = *Cluster of Differentiation*, DZ = dendritische Zellen, MHC = *Major Histocompatibility Complex*, Mock = unbehandelte Kontrolle, MOI = *multiplicity of infection*, T = T-Zellen

### **3.5.3 *E. coli* mpk induziert auch in der Dreifachkultur B-Zell-abhängiges IL-10**

Nach der Inkubation der B-Zell-DZ-Co-Kultur mit OVA-Peptid wurde der Überstand nach Zentrifugation abgenommen, um eine unspezifische Aktivierung der OT-II-T-Zellen durch gelöstes OVA zu verhindern. Damit wurden auch die bis dahin gebildeten Zytokine entfernt und notwendigerweise durch frisches Medium ersetzt. Das ab diesem Zeitpunkt für 72h um die Zellen herum verbleibende Medium wurde mit einem ELISA auf die IL-10-Konzentration hin untersucht (Abbildung 16). Dabei befanden sich in 200 µl Medium  $5 \times 10^5$  B-Zellen und/oder  $1 \times 10^5$  DZ und/oder  $2 \times 10^5$  T-Zellen.

Nennenswerte IL-10-Konzentrationen über 200 pg/ml werden ausschließlich in Kulturen mit B-Zellen gemessen. Dabei macht es keinen signifikanten Unterschied, ob noch zusätzliche Substanzen wie OVA oder CFSE zugegeben wurden. Die B-Zell-Monokulturen produzieren nach *E. coli* mpk-Stimulation etwa 2500 pg/ml IL-10, was signifikant mehr ist als nach *B. vulgatus* mpk-Stimulation mit etwa 1000 pg/ml.

Außerdem ist diese Menge signifikant geringer als nach *E. coli* mpk-Stimulation in der B-Zell/T-Zell-Co-Kultur (ca. 15000 pg/ml) und signifikant weniger als nach *E. coli* mpk-Stimulation in der Dreifachkultur (ca. 500 pg/ml).

## IL-10 im Überstand

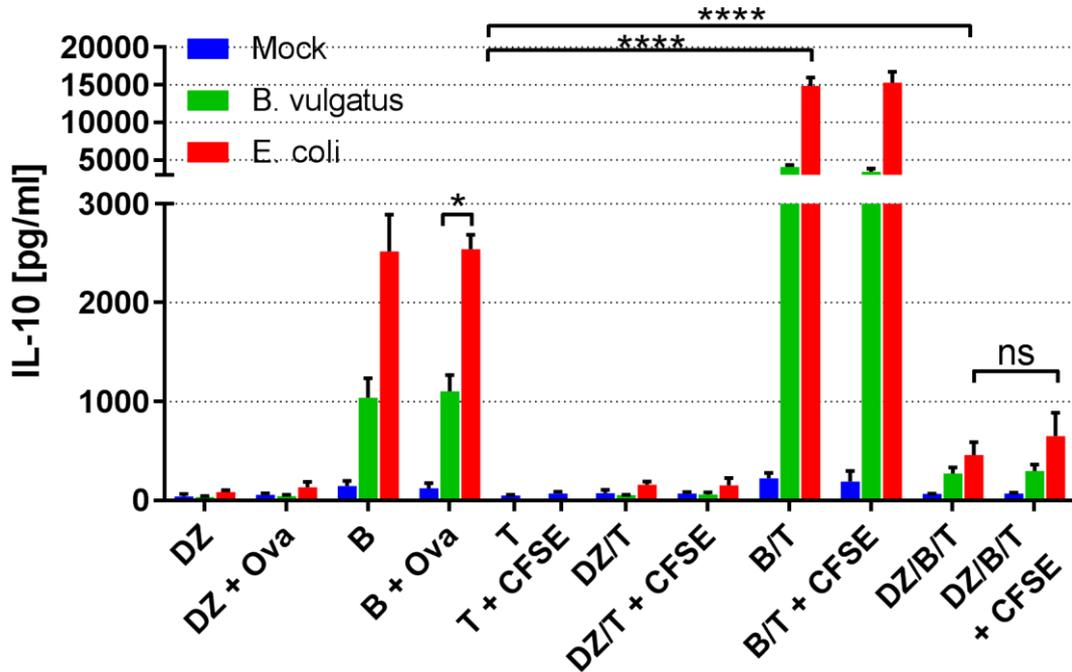


Abbildung 16. Interleukin-10 bestimmt das Mikromilieu der Zellkulturen.

Immature DZ wurden aus dem Knochenmark von Wildtyp-Mäusen differenziert und in Co-Kultur mit 24 h vorstimulierten Wildtyp-B-Zellen gebracht, bevor eine erneute Stimulation (MOI 1) erfolgte. Nach vierstündiger Inkubation mit OVA wurde der Überstand abgenommen und es wurden CD4<sup>+</sup> naive OT-II-T-Zellen zur Co-Kultur gegeben und für 72 h kultiviert. Vor Fixierung der Zellen wurde der Zellkulturüberstand gesammelt und bei -20°C weggefroren. Daraufhin erfolgte eine Analyse mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Die Abbildung zeigt die Konzentration des Zytokins Interleukin-10 (IL-10), wie sie am Ende der 72 h Co-Kultur im Medium der Zellen vorlag.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test oder Mann-Whitney-Test (wenn keine Normalverteilung gegeben war). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb der biologischen Replikate (n = 4). \* p <= 0,05; \*\* p <= 0,01; \*\*\* p <= 0,001; \*\*\*\* p <= 0,0001, ns = nicht signifikant

B = B-Zellen, DZ = dendritische Zellen, IL = Interleukin, Mock = unbehandelte Kontrolle, MOI = *multiplicity of infection*, Ova = OVA-Peptid, T = T-Zellen

### 3.6 Kontaktaufnahme zwischen B-Zellen und dendritischen Zellen

In diesem Teil der Arbeit soll die in den vorherigen Versuchen gemessene Interaktion zwischen den bisher verwendeten Zelltypen im Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden. Ziel war es, die Zellen in einer B-Zell-DZ-Co-Kultur anhand unterschiedlicher Oberflächenmarker in verschiedenen Farben eindeutig identifizierbar zu machen und Zell-Zell-Kontakte sichtbar zu machen.

Die größte Einschränkung bei der Wahl der Sekundärantikörper war die begrenzte Zahl detektierbarer Farben und deren Verfügbarkeit in der gewünschten Reaktivität. Mit der blauen DAPI-Färbung wurden Zellkerne gefärbt, während rot der Aktinfärbung mit Phalloidin vorbehalten war. Die Verwendung eines grünen Cy2-Antikörpers, der gegen einen spezifischen CD19-Primärantikörper gerichtet war, sollte die B-Zell-Membran sichtbar machen. Nach Etablierung eines Kultur- und Färbeprotokolls gelang es, beide Zelltypen auf einem Coverslip zu fixieren und zu färben. DAPI und Phalloidin zeigten im konfokalen Fluoreszenzmikroskop sehr gute Signale. Dadurch konnten besonders die Dendriten unstimulierter DZ deutlich dargestellt werden. Mit *E. coli* mpk-stimulierte DZ zeigten eine etwas stärker kugelförmige Morphologie.

Die Färbung der B-Zell-Monokultur zeigte, dass auch Suspensionszellen mit den in Abschnitt 2.2.8 beschriebenen Methoden zwar in geringer Anzahl, aber doch gut auffindbar auf Coverslips gebracht werden konnten. Allerdings war hier nur die DAPI-Färbung erfolgreich, da die Cy2-Fluoreszenz von Anfang an sehr schwach war und innerhalb weniger Sekunden verblasste. In Kombination mit den anderen Fluoreszenzen wurde das Grün komplett überstrahlt.

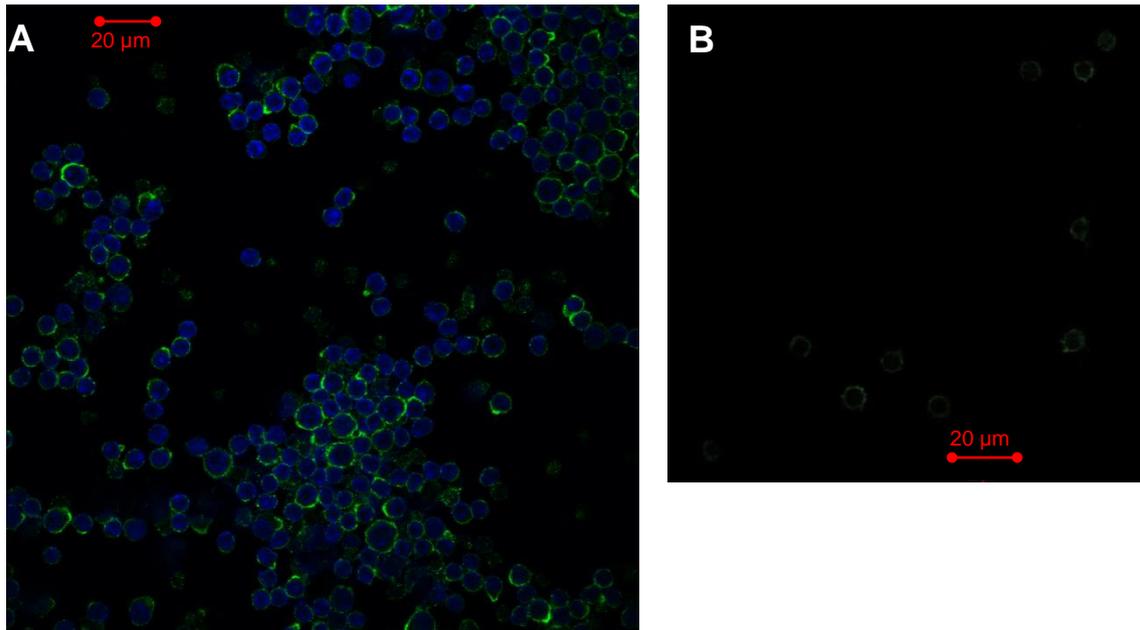


Abbildung 17. B-Zellen im Fluoreszenzmikroskop.

Die Abbildungen zeigen 48 h mit *E. coli* stimulierte und nach der PFA-Fixierung gefärbte B-Zellen im konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Die Zellkerne in A leuchten intensiv blau, während die grüne Fluoreszenz CD19 auf der B-Zell-Membran markiert. In B ist ein anderes Präparat mit gleicher Behandlung gezeigt, in dem nur die schwache Cy2-Fluoreszenz aufgenommen wurde. Der rote Balken ist der Maßstab für 20 µm.

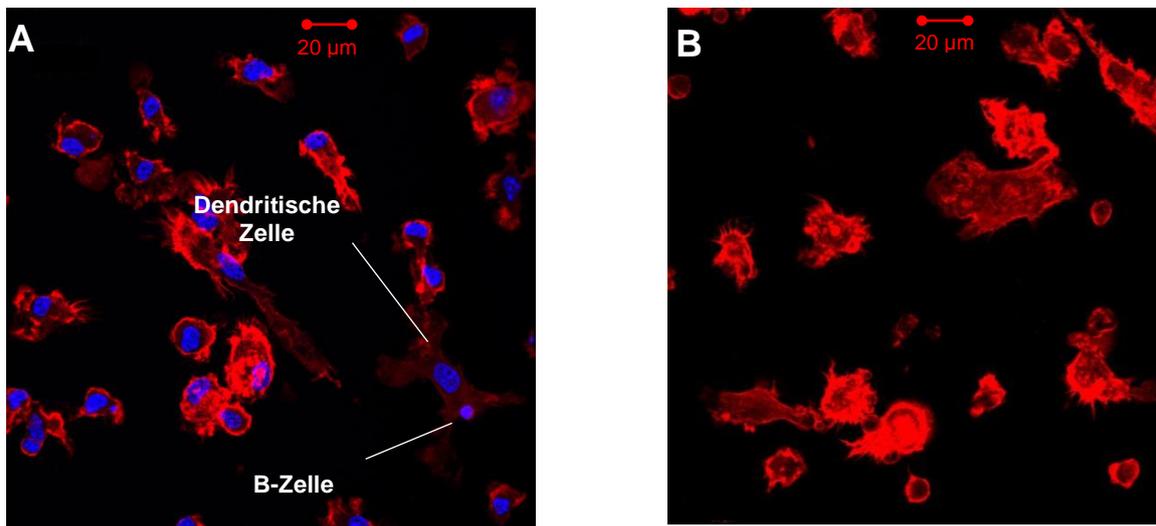


Abbildung 18. B-Zell-DZ-Co-Kultur.

Dendritische Zellen wurden aus sieben Tage kultivierten KGDZs differenziert, 24 h unstimuliert auf einem Coverslip kultiviert und anschließend für einen Tag mit 48 h - *E. coli* mpk-stimulierten B-Zellen inkubiert. Nach kurzem Antrocknen und Fixierung mit 4%igem PFA wurden die Zellen mit 1µg/ml DAPI, Phalloidin TRITC (1:500) und CD19 Primärantikörper sowie Cy2-Sekundärantikörper (beide 1:100) gefärbt. Zur Permeabilisierung für die Phalloidin färbung wurde 0,2%ige Triton-X-100-Lösung verwendet.

In A sind einige dendritische Zellen mit vielen Ausläufern zu sehen, die durch das Phalloidin rot gefärbt sind. Die Zellkerne aller Zellen sind mit DAPI blau gefärbt. Die grüne Cy2-Fluoreszenz war hier nicht stark genug, daher lässt sich die einzige B-Zelle in diesem Bild nur anhand morphologischer Kriterien, wie dem Kern-Plasma-Verhältnis identifizieren.

In B ist eine andere Stelle aus dem gleichen Präparat dargestellt, in der aber nur das TRITC-Signal der Phalloidin-Färbung aufgenommen wurde. Zellkerne erscheinen hier weniger stark gefärbt. Die roten Markierungen stellen einen Maßstab von 20 µm dar.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung

Mit dieser In-vitro-Studie wurde ein neuer Ansatz der Immunhomöostase durch das Mikrobiom evaluiert. Dabei wurden mit Methoden der Zellkultur muriner dendritischer Zellen, B- und T-Zellen und der Durchflusszytometrie die unterschiedlichen Fähigkeiten von Symbionten und Pathobionten untersucht, regulatorische B-Zellen als Mediatoren zur Erzeugung von Toleranz zu induzieren.

Dabei konnte gezeigt werden, dass *E. coli* mpk-die Bildung unterschiedlicher Typen von B<sub>regs</sub> und auch eine gesteigerte Expression regulatorischer Oberflächenmarker induziert. In *E. coli* mpk-stimulierten Proben verschiedener Immunzell-Co-Kulturen wurden verminderte Proliferationsraten bei T-Zellen und gehemmte Maturationsprozesse bei dendritischen Zellen nachgewiesen. Zusätzlich waren phänotypische Veränderungen zu beobachten. Auch das Zytokinprofil der Immunzellen wurde durch die *E. coli* mpk-induzierte Aktivierung von B<sub>regs</sub> vom pro-inflammatorischen Botenstoff TNF- $\alpha$  zum anti-inflammatorischen IL-10 und dem ambivalenten IL-6 verändert.

Mit dem experimentellen Konzept der Dreifachkultur konnte erstmalig gezeigt werden, dass *E. coli* mpk-induzierte B<sub>regs</sub> auch in der wechselwirkenden Interaktion sowohl mit T-Zellen als auch DZ ihre regulatorischen Eigenschaften zur Toleranzerzeugung einsetzen können. Damit kommt dieses Experiment der multifaktoriellen und interzellulär-vernetzten Situation *in vivo* am nächsten.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse und Methoden

### 4.2.1 Der Pathobiont *E. coli mpk* induziert regulatorische B-Zell-Subtypen

Eine wichtige Voraussetzung für diesen Versuch war der Nachweis, dass verschiedene B-Zell-Subtypen existieren, die immunmodulatorische Eigenschaften besitzen und somit in die Gruppe der B<sub>regs</sub> fallen. In dieser Arbeit besonders herausgegriffen wurden die B10-Zellen (CD1d<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup>), wie sie von Yanaba et al. (2008) beschrieben wurden, da diese Zellen die Hauptproduzenten des wichtigsten anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 sind. Außerdem wurden Induktion und Entwicklung der *transitional 2 marginal-zone precursor*-Zellen (T2-MZP; CD21<sup>+</sup> CD23<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup>) untersucht, die in Arbeiten von Evans et al. (2007) inhibitorische Effekte auf die T-Zell-Aktivierung zeigten und im Mausmodell Arthritis Symptome verminderten. Die genannten Oberflächenmarker sind dabei nicht nur zur Identifikation der verschiedenen Phänotypen relevant, sondern vermitteln bei Zell-Zell-Kontakt jeweils eine spezifische Wirkung. Die unterschiedlichen Effekte interagieren und addieren sich schließlich zu einer Gesamtwirkung, die die regulatorische B-Zelle auf ihren Kontaktpartner ausübt. Diese Prozesse sind aber eher als passive Effekte aufzufassen denn als aktive Interaktionen (Maerz et al., 2020).

Kommt nun eine naive B-Zelle mit dem Pathobionten *E. coli mpk* in Kontakt, wird die Immunzelle aktiviert und differenziert zu einem reifen Phänotyp. Beobachtet wurden die reaktive Entstehung von den B<sub>reg</sub>-Subtypen B10-Zellen, M2-MPZ und Tim-1<sup>+</sup>-B-Zellen sowie die Hochregulation verschiedenster regulatorischer Moleküle wie PD-1-L, FasL, CD73, Ebi3 und GitrL (Abbildung 19). Außerdem wurde eine stark erhöhte IL-10-Produktion und z. T. auch IL-6-Sekretion nachgewiesen.

Ein anderer wichtiger Faktor für Dauer und Stärke der Immunreaktion ist die Lebenszeit der Leukozyten. Die Überlebenskurve der in dieser Arbeit untersuchten B-Zellen (vgl. Abschnitt 3.1.1) zeigt deutlich, dass die Bakterien unterschiedlich starken Einfluss auf die Proliferations-Signalwege der B-Zellen nehmen (Maerz et al., 2020). Dabei wirkt die *B. vulgatus mpk*-Stimulation weniger stark proliferativ als die *E. coli mpk*-Stimulation. Dass die TLR2/4-

Knockoutzellen unabhängig vom Stimulus genauso schnell absterben wie die unbehandelten WT-B-Zellen zeigt, dass diese beiden Rezeptoren für den Kontakt zwischen Bakterien und Lymphozyten elementar sind. Vor einigen Jahren kamen Lampropoulou et al. (2008) zu dem gleichen Ergebnis: Auch bei ihnen konnten TLR2/4<sup>-/-</sup> -B-Zellen im Gegensatz zu Wildtyp-B-Zellen nicht vom *Mycobacterium tuberculosis* zur IL-10-Produktion aktiviert werden. Die daraus resultierende geringere T-Zell-Suppression führte schließlich zu einer Verschlimmerung der EAE. Die Mitglieder der Familie der Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind allesamt Transmembranproteine, die auf Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems vorkommen. Bei Aktivierung dieses Rezeptortyps werden intrazelluläre Signalkaskaden (*mitogen-activated protein (MAP) kinase*; NF-κB) in Gang gesetzt, die letztendlich bestimmte Gene aktivieren und so bspw. die MHC-Expression oder Sekretion verschiedener Zytokine erhöhen (Moresco et al., 2011). Zusätzlich scheint die Stimulation des TLR4-Rezeptors in den Überlebens- und Proliferationssignalweg der B-Zellen einzugreifen, wie sowohl unsere Daten als auch die von Schweighoffer et al. (2017) bestätigen. Wie Takeuchi et al. (1999) bei Mäusen zeigen konnten, ist der Toll-like-Rezeptor 2 dagegen vor allem für die Erkennung Gram-positiver Bakterien über Strukturen wie Peptidoglykane zuständig, wohingegen der Toll-like-Rezeptor 4 bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) direkt bindet. Dass die beiden Gram-negativen Erreger *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk so unterschiedliche Effekte hervorrufen, impliziert Strukturunterschiede im Lipopolysaccharid-Molekül, die sich im anschließenden Signalweg niederschlagen. Schon früh zeigten Hashimoto et al. (2002), dass *B. vulgatus* eine Lipid A-Struktur aus vier Fettsäuren und ein einfach phosphoryliertes GlcN<sub>2</sub>-Rückgrat hat. *E. coli* dagegen besitzt sechs Fettsäuren in einem insgesamt zweifach phosphoryliertem Lipid A. Laut dem Review von Erridge et al. (2002) sind besonders die Länge und Anzahl der Fettsäureketten sowie die negativen Ladungen an ganz bestimmten Stellen, die durch die Phosphate resultieren, verantwortlich für die Stärke der Endotoxizität des LPS (Steimle et al., 2019).

Trotz der unterschiedlichen Affinitäten der Bakterienstrukturen zu den Toll-like-Rezeptoren kann trotzdem auch eine Dosisabhängigkeit der Effekte beobachtet werden. So wäre es zwar möglich, dass *B. vulgatus* mpk-Bakterien in sehr hoher Konzentration den gleichen Effekt wie eine geringe Dosis *E. coli* mpk hervorrufen könnten. Allerdings entspräche diese Situation *in vivo* keinem physiologischen Zustand.

Die TLR2/4-Abhängigkeit der Lymphozytenstimulation durch Bakterien könnte zukünftig durch weitere Folgeexperimente überprüft werden. Die Lymphozytenstimulation müsste hierbei mit mehreren neuen Ansätzen durchgeführt werden: Inkubation isolierter LPS-Strukturen von *E. coli* mpk mit (I.) Wildtyp B-Zellen, (II.) TLR2<sup>-/-</sup> B-Zellen (III.) TLR4<sup>-/-</sup> B-Zellen und (IV.) TLR2/4<sup>-/-</sup> B-Zellen. Gleiches gilt für *B. vulgatus* mpk. Aus dem direkten Vergleich zwischen den Ansätzen ließen sich die Anteile der Rezeptoren am Effekt ablesen. Eine ähnliche Herangehensweise findet sich bei Maerz et al. (2018) mit dendritischen Zellen.

Außer über TLR2 und TLR4 können B-Zellen auch über andere Rezeptoren, wie bspw. TLR5, Bakterienbestandteile detektieren. TLR5 erkennt bakterielles Flagellin, welches auch von *E. coli*, nicht aber von *B. vulgatus* exprimiert wird (vgl. Hayashi et al., 2001, Wang et al., 2003). Für die Elimination autoreaktiver B-Zellen und die Erhaltung der Immunhomöostase u. a. durch IL-10-Produktion bei Patienten mit der Autoimmunerkrankung Systemischer Lupus Erythematoses (SLE) konnten Gies et al. (2018) eine entscheidende Rolle von TLR9 belegen. Dieser Rezeptor wird durch CpG-Sequenzen doppelsträngiger DNA aktiviert, wie sie auch in *E. coli* und *B. vulgatus* vorkommen. SLE-Patienten bilden Antikörper gegen diese Genfragmente, was zu einer verminderten Aktivierung von TLR9 und damit zur reduzierten Immuntoleranz führt. Trotzdem ließ sich in den nur für TLR2 und TLR4 gentechnisch veränderten Zellen, und daher TLR5/9-wildtypischen Zellen, kein Unterschied zur unstimulierten Kontrolle feststellen. Möglich ist daher auch eine Interaktion der verschiedenen TLR-Signalwege, die durch die TLR2/4-Knockouts gestört wurde.

Lemoine et al. (2009) postulieren in ihrer Arbeit, dass ausschließlich Signalwege über den B-Zell-Rezeptor, CD40 oder TLR9 zu einer Entwicklung von B<sub>regs</sub> führen können. Unsere Ergebnisse widersprechen dem deutlich, da die Expression von TLR2/4 zu signifikanten Unterschieden gegenüber den Knockouts führt. In den Wildtypzellen löst *E. coli* mpk ein starkes Signal aus: die B-Zellen überleben deutlich länger (vgl. Abbildung 3), differenzieren zu verschiedenen B<sub>reg</sub>-Subtypen (vgl. Abbildung 4) und produzieren IL-6 und IL-10 (vgl. Abbildung 6). Dagegen geschieht in den Knockout-Zellen nahezu nichts: Proliferation und Differenzierung entsprechen unabhängig vom bakteriellen Stimulus dem der unstimulierten Wildtyp-Proben. Auch Yanaba et al. (2008) nutzten LPS, um in Kultur B-Zellen zu IL-10-produzierenden B<sub>regs</sub> zu differenzieren. Offenbar gibt es aber auch Unterschiede darin, welche Subtypen IL-10-produzierender B-Zellen entstehen. Blair et al. (2009) zeigten, dass LPS, CpG und CD40-Ligation zwar alle die Entstehung IL-10-produzierender B-Zellen förderten, dass aber durch CD40-Ligation besonders große Populationen an *transitional 2* B<sub>regs</sub> entstanden.

Diese Beobachtung entspricht ganz der Hypothese, dass Pathobionten, um Toleranz zu erzeugen, ihrer eigenen Immunogenität durch Induktion von Gegenregulationsmechanismen entgegenwirken müssen. Dass der Anteil der meisten regulatorischen Marker nach 72 h wieder etwas sinkt, kann daran liegen, dass nach dieser Zeit in Kultur doch zunehmend Zellen absterben und diese toten Zellen eher eine Aktivierung der B-Zellen in pro-inflammatorischer Richtung bewirken (Zelltrümmer induzieren Entzündung). Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Zahl stimulationsfähiger Bakterien (und damit die MOI) nach dieser Zeit zu gering ist. Um diese Vermutung zu testen, könnte ein ähnliches Experiment durchgeführt werden, bei dem regelmäßig frische Bakterien zugegeben werden, die in der Lage sind, die neu entstandenen B-Zellen zu stimulieren.

Die Stimulation von naiven B-Zellen mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk konnte die Ergebnisse bisheriger Arbeiten, dass B<sub>regs</sub> sich vor allem durch die starke Produktion von IL-10 auszeichnen, reproduzieren. Proben, die laut

Durchflusszytometrie nachweislich große Populationen an regulatorischen B-Zellen haben, zeigen im ELISA auch signifikant erhöhte Konzentration an IL-10. IL-10 ist das prominenteste anti-inflammatorische Molekül, das von den meisten immunregulatorisch wirksamen Zellen produziert wird. Dazu gehören B<sub>regs</sub>, T<sub>regs</sub>, aber auch Monozyten, dendritische Zellen, NK-Zellen und Makrophagen (Akdis et al., 2016).

Der heterodimere IL-10R1/IL-10R2-Rezeptorkomplex (IL-10R) aus der Familie der Interferon-Rezeptoren, wird auf verschiedenen Zelltypen exprimiert, darunter DZ, T- und B-Zellen. Dort wird bei IL-10-Bindung eine Kaskade der *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1) Proteine und vieler anderer in Gang gesetzt, die schlussendlich pro-inflammatorische Zytokinproduktion inhibieren, Aktivierungszustände modulieren und T-Zellen supprimieren (vgl. Verma et al., 2016, Couper et al., 2008). Dass in dieser Arbeit auch die Expression des IL-10R auf B-Zellen selbst untersucht wurde, die die Hauptproduzenten von IL-10 sind, beruht auf den Ergebnissen von Heine et al. (2014), die zusätzlich zum parakrinen auch einen autokrinen Effekt von B-Zell-eigenem IL-10 auf die Differenzierung menschlicher B-Zellen zeigten. Die hier erbrachten Ergebnisse gehen dabei sogar noch einen Schritt weiter in Richtung der Grundhypothese, da hier gezeigt werden konnte, dass IL-10R auf 20 % aller *E. coli* mpk-stimulierten B-Zellen vorhanden ist. Zusätzlich bringen die Daten den Nachweis, dass diese Tatsache von der Art der Stimulation stark abhängig ist und eine *B. vulgatus* mpk- oder gänzlich fehlende Stimulation nur zu einer IL-10R-Expression auf rund 10 % der B-Zellen führt. Diese gegenseitige Regulation der Immunzellen durch IL-10 wird entscheidend durch den Zeitpunkt, die Konzentration und die genaue Lokalisation der IL-10-Ausschüttung beeinflusst. Damit ist es wahrscheinlich, dass das Ausmaß der Entzündungsreaktion (hier durch den Unterschied von Symbiont und Pathobiont ausgelöst) die Stärke der IL-10-Anwort bestimmt (Couper et al., 2008).

Gibt es einen Defekt im komplexen System der IL-10-Regulation, kann eine in Gang gesetzte Immunantwort deutlich schlechter limitiert bzw. wieder abgeschaltet werden. Daraus kann eine höhere Anfälligkeit für Autoimmunerkrankungen resultieren. Insbesondere von B-Zellen produziertes

IL-10 scheint dabei von größter Wichtigkeit zu sein (vgl. Kalampokis et al., 2013, Fillatreau et al., 2002). Chimäre Versuchstiere mit IL-10-defizienten B-Zellen zeigten einen schlechteren Krankheitsverlauf bei autoimmuner Arthritis (Carter et al., 2011) oder experimenteller autoimmuner Enzephalitis (Bettelli et al., 1998). Zahlreiche Experimente zeigen, dass ein Transfer von IL-10-kompetenten B-Zellen in die IL-10-defizienten Versuchstiere den Verlauf der Autoimmunprozesse durch eine anti-inflammatorische Wirkung günstig beeinflussen kann (vgl. Mauri et al., 2003, Matsushita et al., 2008). Umgekehrt ermöglichte der Transfer IL-10-defizienter B-Zellen in autoimmun erkrankte (Mauri et al., 2003) oder transplantierte Tiere keine immun-dämpfende Wirkung und somit keine Toleranz gegenüber transplantierten Organen (Zhao et al., 2010), wodurch die Autoren die zentrale Rolle von IL-10 bei der Immunregulation bestätigt sehen. Die Gruppe um Ray et al. (2012) argumentiert dagegen, dass IL-10 ausdrücklich nicht notwendig sei, um eine Autoimmunerkrankung zu lindern. In ihren Versuchen erzielte auch die Übertragung IL-10-defizienter B-Zellen eine Besserung, die durch Expression von GitrL eine T<sub>reg</sub>-Proliferation induzierte.

Dass die Konzentrationen des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  in der Umgebung der B-Zellen gering sind, unterstützt die Hypothese, dass durch *E. coli* mpk-Kontakt keine entzündungsfördernden B-Zellen, sondern vorwiegend B<sub>regs</sub> entstehen.

Damit steht der Anstieg von IL-6 in *E. coli* mpk-stimulierten Kulturen scheinbar im Widerspruch. Ähnliche Ergebnisse erhielten Barr et al. (2012): Auch hier reagierten Marginalzonen-B-Zellen mit IL-6-Sekretion auf eine LPS-Stimulation. Allerdings muss beachtet werden, dass die von B-Zellen produzierte IL-6-Menge deutlich geringer ist, als es nach Stimulation dendritischer Zellen der Fall ist. Ob das B-Zell-IL-6 hier mengenmäßig eine biologische Relevanz hat, ist fraglich.

IL-6 ist überwiegend als pro-inflammatorisch bekannt, da es eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von T-Zellen an den Entzündungsort spielt und von Curnow et al. (2004) auch als anti-apoptotischer Faktor für T-Zellen identifiziert

wurde (Scheller et al., 2011). Zusätzlich haben verschiedene Arbeiten gezeigt, dass IL-6 die Differenzierung von naïven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, wie sie hier auch verwendet wurden, zu Th2 und Th17-Zellen fördert und die T<sub>reg</sub>-Entstehung unterbindet (vgl. Diehl and Rincon, 2002, Bettelli et al., 2006).

Allerdings wurden unterschiedliche Signalwege von IL-6-Rezeptoren entdeckt, die zum Teil sogar gegensätzliche Wirkungen zu haben scheinen. Beispielsweise werden über den selteneren membrangebundenen IL-6-Rezeptor (*classic-signaling*) vor allem Regenerationsprozesse von Epithelgewebe angeregt und positive Effekte auf Metabolismus und Insulinresistenz vermittelt. Im Tierexperiment war IL-6 sogar in der Lage, Influenza-induzierte Entzündungen und schwere Lungenschädigungen zu mindern (Lauder et al., 2013). Die aktuelle Datenlage impliziert also eine entscheidende Rolle für IL-6 bei der Orchestrierung der Immunantwort sowohl zu Beginn als auch beim Abklingen. In der Arbeit von Rosser et al. (2014) zeigen die Autoren im Mausmodell, dass beide Zytokine IL-6 und IL-1 $\beta$  zur Bildung von IL-10-produzierenden B<sub>regs</sub> führen. In Mäusen, denen die Rezeptoren für diese Zytokine fehlten, war die B<sub>reg</sub>-Anzahl vermindert, sodass es in diesen Tieren zu einer stärkeren Ausprägung der Arthritis kam.

Aber nicht nur die löslichen Moleküle sind Teil der Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen. Auch die Oberflächenmoleküle nehmen bei direktem Zell-Zell-Kontakt Einfluss auf Signalwege. Die Gruppe um van de Veen et al. (2016) fasst den aktuellen Wissensstand zur Funktion der phänotypisch relevanten *Cluster of differentiation* zusammen: CD1d auf der B<sub>reg</sub>-Oberfläche ist an der Lipidantigen-Präsentation beteiligt. CD5 und CD22 hemmen die durch den B-Zell-Rezeptor ausgelöste Signalkaskade, die zur Aktivierung von Effektor-B-Zellen führt. CD23 fungiert als Oberflächenrezeptor für das an Allergien beteiligte Immunglobulin E, weshalb CD23 auch als Ansatzstelle einer Therapie für allergische Rhinitiden diskutiert wird (Chen et al., 2018).

Die Häufigkeitsverteilung der beschriebenen Oberflächenmarkerkombinationen lässt zudem weitere Schlüsse zu: Dass die Addition der prozentualen Anteile der B10- und der T2-MZP-Zellen zu einem Wert über 100 % führen, könnte

darauf zurückzuführen sein, dass es Überschneidungen der beiden Phänotypen gibt. Überlappende Phänotypen beschrieb auch van de Veen et al. (2016). Beispielsweise könnten B10-Zellen zusätzlich CD21<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup> und CD24<sup>+</sup> sein und umgekehrt ebenso. Das zeigt, dass die Einteilung der B<sub>regs</sub> in voneinander zu unterscheidende Phänotypen eine künstliche ist, die für die Erforschung spezieller Funktionen zwar notwendig ist, aber die Komplexität und ständig im Umbau befindliche Zellbiologie nur bedingt abbilden kann.

Weitere als anti-inflammatorisch bekannte Oberflächenmarker wurden ebenfalls untersucht. Hierbei wurde eine signifikant gesteigerte Expression nach Pathobionten-Stimulation festgestellt:

Zu den untersuchten Molekülen gehört das *T cell immunoglobulin and mucin domain 1* (Tim-1), ein co-stimulatorisches Transmembranprotein u. a. auf T-Zellen, das bei Menschen auch als zellulärer Hepatitis-A-Virus-Rezeptor bezeichnet wird (Kane, 2010).

Aravena et al. (2017) zeigten erst kürzlich, dass speziell die Population der TIM-1 positiven B<sub>regs</sub> bei Patienten mit der Autoimmunkrankheit Systemische Sklerose vermindert ist und B-Zellen allgemein geringere Fähigkeiten zur CD4<sup>+</sup> T-Zell-Suppression aufweisen. Diese Vermutung bestätigen sich insofern, als in *E. coli* mpk-stimulierten Proben, die laut unseren Analysen signifikant mehr B<sub>reg</sub> entwickeln, auch ein höherer Anteil Tim-1<sup>+</sup> B-Zellen enthalten ist. Auf der anderen Seite steht allerdings die Studie von Nozaki et al. (2014), die durch eine Anti-Tim-1-Therapie die Lupus-assoziierte Nierenschädigung verringern konnten. Auch Ma et al. (2011) beobachtete, dass Tim-1 auf aktivierten B-Zellen die Proliferation, Differenzierung und Antikörperproduktion verstärkte. Tim-1 wird auf vielen unterschiedlichen Immunzellen exprimiert, darunter auch aktivierte T-Zellen, auf denen sie Proliferation und Zytokinsekretion fördern und periphere Toleranz unterbinden (Umetsu et al., 2005). Mittlerweile sind unterschiedliche Forschungsgruppen zu dem Schluss gekommen, dass die Bindung eines Tim-Liganden an Tim-1 auf T-Zellen deren Polarisation in Richtung Th2 fördert, wohingegen die Ligation von Tim-3 eher die Th1-Immunantwort befeuert (vgl. Moss et al., 2004, Kuchroo et al., 2003, McIntire et al., 2001). Tim-1-Liganden werden konstitutiv auf B-Zellen exprimiert (Ma et al.,

2011) und könnten daher für die in Abschnitt 0 aufgezeigten Ergebnisse einer leicht verstärkten Th2-Reaktion mit verantwortlich sein. Weitere mögliche Liganden sind TIM-4, die auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden (Meyers et al., 2005). Die Datenlage spricht also für eine sehr heterogene Rolle der Tim-Proteinfamilie im Immunsystem, mit Schwerpunkt auf co-stimulatorischen Vorgängen bei der T-Zell-Differenzierung.

Das Ekto-Enzym CD73 zeigt ebenfalls eine verstärkte Expression auf *E. coli* mpk-stimulierten B-Zellen. Obwohl hier nicht die Expression auf B<sub>regs</sub> gemessen wurde, sondern in der Gesamtpopulation der CD19<sup>+</sup> Zellen, kann trotzdem davon ausgegangen werden, dass CD73 hier eine regulatorische Funktion erfüllt. Gemessen wurde das Enzym, weil Kaku et al. (2014) nachwies, dass CD73 zu 30-50 % auf B<sub>regs</sub> vorkommt, in anderen B-Zell-Populationen dagegen deutlich seltener exprimiert ist. Außerdem zeigte die Gruppe, dass die Adenosinproduktion des Komplexes aus CD73 und CD39 Colitis-assoziierte Entzündungen vermindern kann. Diese Effekte sind für sich selbst IL-10 unabhängig, wobei aber die Expression von CD73 auf der Oberfläche parakrin und autokrin über IL-10 moduliert wird. Bezogen auf die hier untersuchten Zusammenhänge bedeutet das, dass *E. coli* mpk über CD73 auf B-Zellen regulatorisch wirkt, aber höchstwahrscheinlich erst durch zusätzliches Einwirken von IL-10 aus B<sub>regs</sub> effektiv an Einfluss gewinnt. Ray et al. (2015) fassen in ihrem Review weitere IL-10 unabhängige, B<sub>reg</sub>-vermittelte Signalwege zusammen. Darunter die in Abschnitt 0 ebenfalls analysierten Marker PD-1-L, FasL und *Ebi3* (IL-35-Untereinheit). Danach wirken sowohl PD-1-L als auch FasL über den Apoptoseweg: PD-1-L auf B-Zellen reguliert die Entwicklung, Erhaltung und Funktion von T<sub>regs</sub> (vgl. Bodhankar et al., 2012, Francisco et al., 2009), wohingegen der Fas-Ligand durch Interaktion mit dem Fas-Rezeptor bspw. pro-inflammatorische Immunzellen in den Tod führen kann (Minagawa et al., 2004). Diese Eigenschaften bieten also die biologische Erklärung, warum *E. coli* mpk-stimulierte B-Zellen durch die vermehrte Expression dieser Proteine tolerogen wirken können.

Das *Epstein-Barr virus-induced gene 3 (Ebi3)* zeigt eine prozentuale Häufigkeit von ca. 17 % auf allen B-Zellen, die 48 h Kontakt zu *E. coli* mpk hatten und

damit signifikant mehr als dies ohne Stimulation oder nur in *B. vulgatus* mpk-stimulierten Proben der Fall war. Auch hier ist es wahrscheinlich, dass *E. coli* mpk dieses Molekül zur Toleranzentwicklung nutzt. *Ebi3* kann gemeinsam mit anderen Untereinheiten als Heterodimer entweder das Interleukin-27 oder -35 formen, die beide Immunreaktionen herunterregulieren können. Besonders IL-35 wird vorwiegend von T<sub>regs</sub> und B<sub>regs</sub> produziert. Bohme et al. (2016) haben die zellulären Vorgänge dahinter weiter untersucht und herausgefunden, dass *Ebi3* die Immunantworten von Th1-, Th2- und Th17-Zellen unterdrücken kann. Diese Erkenntnisse beruhen auf Beobachtungen erhöhter Mortalität und Parasitämie von *Ebi3*-defizienten Mäusen gegenüber den Wildtypen bei *Trypanosoma cruzi*-Infektion. Der exakte Mechanismus ist noch unklar. IL-35, eines der Endprodukte von *Ebi3*, scheint zudem, noch vor IL-10, besonders in der T-Zell-vermittelten demyelinisierenden Autoimmunerkrankung Experimentelle-Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) eine entscheidende Rolle zu spielen (Shen et al., 2014). Allerdings ist *Ebi3* ebenso in der Lage, den pro-inflammatorischen, sog. *trans*-Signalweg, des IL-6 zu verstärken und damit Endothelzellen zur Chemokinproduktion anzuregen (Chehboun et al., 2017).

Wie von Ray et al. (2012) gezeigt wurde, besteht ein weiterer Mechanismus zur Erzeugung von Toleranz und der Verhinderung von Autoimmunität, wie der EAE, in der Erhaltung von T<sub>regs</sub> über die Expression des *glucocorticoid-induced TNFR ligand* (Gitr-L). Dies passt sehr gut zu der Beobachtung, dass GitrL auf B<sub>regs</sub> durch *E. coli* mpk ebenfalls hochreguliert wird. Die exakte physiologische Rolle der Gitr-L/Gitr-Interaktion auf Immunzellen ist noch nicht bis ins Detail verstanden. Experimentellen Beobachtungen zufolge agiert der Rezeptor Gitr co-stimulatorisch bei T-Zell-Rezeptor-Aktivierung. Dadurch wird die Proliferation von Effektor-T-Zellen und regulatorischen T-Zellen gefördert. Auch van Olfen et al. (2009) beobachteten bei Mäusen, die Gitr-L konstitutiv auf B-Zellen exprimierten, eine längere Resistenz gegen EAE durch Regulation der T-Zell-Zahl, was die immunregulatorische Funktion dieser Moleküle unterstützen würde.

Dieses Experiment zeigt also deutlich, dass der Pathobiont *E. coli* mpk über multiple Wege immundämpfende Mechanismen in Gang setzen kann (vgl. Abbildung 19).

Die prinzipielle Übertragbarkeit der an murinen Lymphozyten gewonnenen Ergebnisse auf das menschliche Immunsystem ist für die meisten Studien und Experimente gut möglich. Allerdings darf nicht außer Acht gelassen werden, dass auch hoch konservierte Strukturen wie die Toll-like-Rezeptoren kleineren evolutionären Veränderungen unterliegen. Dies betrifft besonders hochspezialisierte Systeme wie die Immunhomöostase. Genetische Unterschiede und Veränderungen in der Art der Genregulation und Transkription für TLR2, TLR3 und TLR4 wurden von Rehli (2002) beschrieben, allerdings bleibt die Frage, ob diese auch eine veränderte Funktion der Rezeptoren zur Folge haben. Auch die basale Expression der Rezeptoren in unterschiedlichen Geweben und Organen zeigt Spezies-abhängige Unterschiede.

Dass regulatorische B-Zellen und hierbei insbesondere die B10-Zellen als wichtigste IL-10-Produzenten auch in vivo Entzündungs- und Autoimmunprozesse entscheidend beeinflussen, wurde bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen. Matsushita et al. (2008) zeigten in B-Zell-depletierten Wildtypmäusen, dass allein der adoptive Transfer von IL-10-produzierenden B10-Zellen eine Besserung der Autoimmunenzephalitis bewirkte. Während eines Autoimmungeschehens in B-Zell-gesunden Tieren proliferiert die B<sub>reg</sub>-Subpopulation bis auf das Vierfache der ursprünglichen Anzahl (vgl. Anderson and Bluestone, 2005, Yanaba et al., 2009, DiLillo et al., 2010).

Der wichtigste B<sub>reg</sub>-Subtyp, die B10-Zellen, wurde bereits beim Menschen nachgewiesen. Iwata et al. (2011) identifizierten humane B10-Zellen, die sich besonders in der Subpopulation der CD24<sup>hi</sup> CD27<sup>+</sup> Zellen fanden und die IL-10- vermittelt immunmodulativ wirkten. Ähnlich wie in den Tierversuchen wurden auch bei 91 Patienten mit verschiedensten Autoimmunerkrankungen signifikant erhöhte Blutspiegel von reifen B10-Zellen und B10-Vorläuferzellen gemessen (Iwata et al., 2011).

Die Datenlage zeigt also, dass ganz besonders B10-Zellen mit ihrem IL-10 eine große Relevanz für Immunhomöostase und Autoimmunität in Tier und Mensch besitzen.

#### **4.2.2 Einfluss auf andere APZ: $B_{regs}$ mindern Maturation dendritischer Zellen**

Dass  $B_{regs}$  durch Pathobiontenstimulation die nötigen Kommunikationsmittel in Form von Oberflächenmolekülen und Zytokinen entwickeln, um andere antigenpräsentierende Zellen zu beeinflussen, wurde in Abschnitt 3.1 und 4.2.1 bereits erläutert. In weiteren Experimenten wurden nun die tatsächlichen Effekte stimulierter B-Zellen auf die Maturation dendritischer Zellen untersucht. Dabei wurde in zwei Ansätzen verglichen, welche Rolle eine rein indirekte Zellkommunikation mittels löslicher Stoffe gegenüber direktem Zellkontakt einnimmt. Die Ausgangshypothese war, dass *E. coli* mpk-induzierte  $B_{regs}$  die Maturation dendritischer Zellen hemmen könnte und dabei sowohl Zytokine als auch direkten Zell-Zell-Kontakt benötigte.

Frick et al. (2006) zeigten, dass die DZ-Maturation durch direkte *E. coli* mpk-Stimulation stärker vorangetrieben wird als durch direkte *B. vulgatus* mpk-Stimulation, die die dendritischen Zellen nur zu einem semi-maturen Status aktivierte. Welchen Einfluss nun die Co-Kultur mit  $B_{regs}$  auf diesen Prozess hat, wollten wir im vorliegenden Versuch herausfinden.

Zuallererst ergibt sich aus den Ergebnissen mit rekombinantem IL-10 und dessen neutralisierendem Antikörper, dass beide ihre Funktion erfüllen: Die Expression aller Maturationsmarker auf dendritischen Zellen reagiert sensibel auf das rekombinante IL-10 und sinkt deutlich erkennbar. Der Anti-IL-10-Antikörper ist in der Lage, diesen Effekt wieder aufzuheben. Auch in nahezu allen anderen Mono- und Co-Kulturen führt die Anti-IL-10-Gabe in *E. coli* mpk-stimulierten Proben zu einer Erhöhung der Maturationsmarker im Vergleich zur *E. coli* mpk-Probe ohne den Antikörper. Dies lässt sich biologisch damit erklären, dass IL-10 überall eine Rolle spielt und die DZ-Maturation, die bei direktem Kontakt zu *E. coli* mpk in Gang gesetzt wird, bremst. *E. coli* mpk induziert also zwei entgegengesetzte Mechanismen: *E. coli* mpk wirkt auf DZ direkt maturationsfördernd; sind allerdings noch B-Zellen mit im Spiel, werden diese durch *E. coli* mpk-Kontakt zu IL-10-produzierenden  $B_{regs}$ , die die DZ-Maturation hemmen.

Die ELISA-Ergebnisse zeigen, dass auch hier die Neutralisierung von IL-10 durch Anti-IL-10-Antikörper gut funktioniert (vgl. Abbildung 13). In den Kontrollmonokulturen von B-Zellen wurden ähnliche IL-10-Verhältnisse verglichen mit dem B-Zell-Charakterisierungsexperiment gemessen.

Der Vergleich der mittels ELISA gemessenen IL-10-Mengen in den verschiedenen Co-Kulturen bestätigt die Ausgangshypothese des Experiments: die  $B_{regs}$  führen zu einem Anstieg an IL-10 in den DZ/B-Zell-Co-Kulturen, der nicht allein mit der Addition der IL-10-Produktionen von DZ- und B-Zell-Monokulturen erklärt werden kann (vgl. Abbildung 13). Stattdessen lässt sich daraus schließen, dass hier ein multiplikativer Prozess stattfinden muss, in dem sich *E. coli* mpk-stimulierte B-Zellen und dendritische Zellen gegenseitig zur gesteigerten IL-10-Bildung stimulieren. *E. coli* mpk bewirkt sowohl bei B-Zellen alleine als auch bei DZ alleine eine stärkere IL-10-Produktion, als dies bei *B. vulgatus* mpk der Fall ist. Dieses IL-10 kann nun auto- und parakrin wirken und die anti-inflammatorischen Vorgänge befeuern.

Betrachtet man die Ergebnisse der DZ-Maturationsmarker, ist allerdings kaum eine signifikante Inhibition der DZ-Maturation durch *E. coli* mpk-stimulierte B-Zellen zu erkennen, wie die ELISA-Ergebnisse eigentlich erwarten ließen. Zwar war für CD40, CD80 und CD86 jeweils eine signifikante Reduktion der Expression in den indirekten *E. coli* mpk-DZ-/B-Zell-Kulturen gegenüber den DZ-Monokulturen nachweisbar, aber diese Reduktion war bei Weitem nicht so stark, um die Zellen als semi-matur zu bezeichnen (vgl. Abbildung 12). Überraschenderweise war der Einfluss der direkten Zell-Kultur auf die Reduktion der Maturationsmarker noch geringer. Rein hypothetisch könnte der enge Kontakt der B- und dendritischen Zellen untereinander der Herabregulation der Oberflächenmarker entgegengewirkt haben. Besonders CD40 fungiert als wichtiger Kontaktmarker, der durch Ligation die Expression weiterer Kontaktmoleküle wie CD80, CD86 und MHC-II hochreguliert (Caux et al., 1994). In der Kombination mit T-Zellen, wie sie im Experiment der Dreifachkultur durchgeführt wurde, war die DZ-Maturationshemmung durch  $B_{regs}$  schließlich deutlich erkennbar (vgl. Abbildung 14 und Abschnitt 3.5.1).

Allerdings ist der Maturationsstatus der dendritischen Zellen nicht alleine ausschlaggebend für die weiteren Effekte: Brix et al. (2010) haben herausgefunden, dass nicht nur die Tatsache, dass eine vorstimulierte DZ Bakterienbestandteile für CD4<sup>+</sup>-T-Zellen präsentiert, zur T-Zell-Aktivierung führt. Vielmehr bestimmt sowohl die Zusammensetzung des DZ-Signalkomplexes als auch die Komposition der T-Zell-Membran über den Effekt der Bakterienpräsentation. CD80 führte in dieser Studie eher zu einer Proliferationsaktivierung der T-Zellen, wohingegen CD40 und CD86 die Aggressivität der T-Zellen eher dämpfen.

Die Ausgangshypothese für die In-vitro-Co-Kultur der drei wichtigsten Immunzellen war, dass die Maturation der dendritischen Zellen durch *E. coli* mpk in den Mehrfachkulturen indirekt unterdrückt wird. Dabei wurden regulatorische B- oder T-Zellen als Mediatoren von *E. coli* mpk in Betracht gezogen. Da in den Transwell-Experimenten mit der B-Zell/DZ-Co-Kultur keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden konnten, war die Hoffnung, dass die Kombination mit T-Zellen einen sichtbaren Unterschied bringen könnte. Dagegen wurde von der DZ-Monokultur eine stärkere Maturation durch die direkte *E. coli*-mpk Stimulation erwartet.

Betrachtet man die Maturationsentwicklung dendritischer Zellen von DZ-Monokultur über DZ/T-Co-Kultur bis hin zur Dreifachkultur, wie in Abschnitt 3.5.1 erläutert, fällt auf, dass die DZ eine deutlich erhöhte Expression der Maturationsmarker in unstimulierten und *B. vulgatus* mpk-stimulierten Ansätzen zeigen, sobald die Zellen in einer Co-Kultur mit T-Zellen sind (vgl. Abbildung 14). Vergleicht man diese Beobachtung mit den Maturationsergebnissen des B-Zell/DZ-Transwell-Experiments, war ein solcher Anstieg nur durch Co-Kultur mit B-Zellen nicht nachzuweisen. Da OVA als unspezifischer Aktivator ausgeschlossen werden konnte, wäre eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen, dass selbst die naiven T-Zellen ein besonderes Mikromilieu erzeugen, welches eine DZ-Maturation begünstigt.

*E. coli* mpk-stimulierte B-Zellen unterdrücken dagegen in der Dreifachkultur sichtbar die Maturation der dendritischen Zellen, wie wir es eigentlich schon im

Transwell-Experiment erwartet hatten. Dass dieser Effekt nur in der Dreifachkultur sichtbar war, könnte mit zwei Faktoren zusammenhängen. Zwar könnte die längere Kulturdauer (vgl. Abbildung 1) zur Akkumulation von durch  $B_{\text{regs}}$  produziertem IL-10 geführt haben, was auch schon in anderen Studien die DZ-Maturation gehemmt hat (Rizzuti et al., 2015). Jedoch wurde schon im T-Zell-Proliferationsassay mit vorstimulierten B-Zellen gezeigt, dass T-Zellen, die Kontakt zu *E. coli* mpk-stimulierten B-Zellen hatten, tendenziell mehr anti-inflammatorische Phänotypen aufweisen. Somit könnten diese die  $B_{\text{reg}}$ -Wirkung verstärken und die DZ-Maturation unterdrücken. Pennati et al. (2016) konnten zeigen, dass  $B_{\text{regs}}$  nicht nur  $\text{Foxp3}^+$   $T_{\text{regs}}$  induzieren können, sondern auch die Bildung  $\text{Foxp3}^-$  IL-10-produzierender Typ-1-regulatorischer  $\text{CD4}^+$  T-Zellen. Das IL-10 der T-Zellen und der B-Zellen gemeinsam hat nun starke Effekte auf die Maturation der DZ und kann gleichzeitig in positiver Rückkopplung auf die Produktion von noch mehr IL-10 aus T- und B-Zellen wirken.

Weiterführende Studien könnten diese Hypothesen überprüfen. Dazu könnte eine weitere B-/T-Zell-Co-Kultur Aufschluss geben. Hierbei sollten naive T-Zellen (ohne CFSE) mit  $B_{\text{regs}}$  inkubiert werden und die Phänotypen der entstandenen reifen T-Zellen genauer untersucht werden. Besonders wäre dabei auf  $T_{\text{regs}}$  und IL-10-produzierende T-Zellen zu achten. Weiterhin könnten diese regulatorischen T-Zellen mit dendritischen Zellen in Kultur gehalten werden, um den oben vermuteten Effekt der DZ-Maturationshemmung nachzuweisen.

In der Interaktion von *E. coli* mpk-induzierten  $B_{\text{regs}}$  mit anderen antigenpräsentierenden Zellen waren insgesamt deutliche Effekte sichtbar, die in sich schlüssig zusammenpassen:

Der Pathobiont *E. coli* mpk induziert B-Zellen zur Differenzierung zu anti-inflammatorischen  $B_{\text{regs}}$ , entfaltet aber gleichzeitig pro-inflammatorische Effekte über die Induktion maturer DZ. Regulatorische B-Zellen wiederum produzieren ihr stärkstes Effektormolekül IL-10, das auto-/und parakrin über den auch auf B-Zellen exprimierten IL-10R wirken kann und parakrin die reaktive Maturation dendritischer Zellen auf eine *E. coli* mpk-Stimulation hemmt. Letzteres wird besonders deutlich über das veränderte Zytokinprofil mit geringeren Mengen

TNF- $\alpha$  und gesteigerten Konzentrationen an IL-10. Kommen zusätzlich naive T-Zellen mit ins Spiel, scheint dieser anti-inflammatorische Effekt der B<sub>regs</sub> noch verstärkt zu werden und die Maturationshemmung wird auch in der verminderten Expression maturationsstypischer Marker erkennbar (vgl. Abbildung 19).

Ziętara et al. (2014) fassen in ihrem Review die neueren Forschungsergebnisse zum Thema B-Zell-vermittelte Modulation der DZ-Funktion zusammen. Besonders hervorgehoben werden dabei die schon länger bekannten IL-10- und TGF- $\beta$ -abhängigen Effekte: von regulatorischen B-Zellen produzierte anti-inflammatorische Zytokine vermindern die Produktion pro-inflammatorischer Botenstoffe in dendritischen Zellen (vgl. Steinbrink et al., 1997, Bhattacharyya et al., 2004).

Besonders die Ergebnisse von De Smedt et al. (1997) zeigen tolerogene Effekte von IL-10, die wir in sehr ähnlicher Weise auch bei unseren Experimenten beobachten konnten. *In vitro* ließ man dendritische Zellen unter IL-10-Einfluss maturieren. Anschließend zeigten diese DZ *in vivo* eine deutlich verminderte Fähigkeit, eine Th1-Antwort zu induzieren und bewirkten eher eine Entwicklung von Th2-Zellen. Diese Beobachtungen wurden auf eine verminderte IL-12- und IFN- $\gamma$ -Produktion der dendritischen Zellen zurückgeführt.

Die Datenlage zu Inhibitionsmechanismen von dendritischen Zellen durch B<sub>regs</sub> ist bislang sehr lückenhaft. Insbesondere die Existenz von Pathobionten-induzierter modulatorischer Wirkung auf APZ wird in dieser Arbeit erstmals ausführlicher thematisiert.

#### **4.2.3 B<sub>regs</sub> inhibieren pro-inflammatorische T-Zellen**

T-Zellen sind mit ihren biologischen Hauptfunktionen Zytolyse/Zytotoxizität, Mobilisierung von Effektormechanismen durch Helferzellen und Regulation durch T<sub>regs</sub> essenziell für eine funktionierende Immunreaktion. B-Zellen greifen vielfältig an unterschiedlichen Stellen des T-Zell-Systems ein und beeinflussen Zellproliferation und Phänotypentwicklung. B-Effektorzellen wirken dabei aktivierend und entzündungsfördernd, B<sub>regs</sub> hemmen dagegen pro-

inflammatorische Mechanismen. Pathobionten können also über die Induktion von B<sub>regs</sub> tolerogen wirken.

In einem T-Zell-Proliferationsassay, der in 72-stündiger-Co-Kultur mit vorstimulierten B-Zellen durchgeführt wurde, konnten weitere Erkenntnisse über die B-Zell-vermittelte Toleranzerzeugung des Pathobionten *E. coli* mpk gewonnen werden: In Co-Kulturen mit T-Zellen, die auf unstimulierte B-Zellen, also immer noch im naïven Zustand befindlich, trafen, kam es sichtbar zur Proliferation. Grund dafür ist vermutlich die konstitutive Basalexpression von MHC-II auf der B-Zell-Oberfläche (vgl. Ma et al., 2012, Matsuki et al., 2007), wodurch diese auch unaktiviert in der Lage sind, das zugegebene OVA-Peptid zu präsentieren.

Die in Abschnitt 3.3.1 dargestellten Ergebnisse zeigen eine deutliche Proliferationshemmung der T-Zellen durch *E. coli* mpk-vorstimulierte B-Zellen. Ausgehend von den Resultaten der B-Zell-Charakterisierung (vgl. 3.1) lässt sich außerdem annehmen, dass dieser Effekt hauptsächlich B<sub>reg</sub>-vermittelt ist, da diese regulatorische Subpopulation 48 h nach Stimulation allein schon etwa die Hälfte aller B-Zellen ausmacht. Die Inhibition der Proliferation scheint allerdings auch dosisabhängig zu sein, da der Effekt mit zunehmendem Verhältnis von B- zu T-Zellen stärker wird. Ursächlich dafür könnte sein, dass mehr B-Zellen für eine höhere Konzentration an IL-10 im Medium sorgen. Dies würde auch erklären, dass *B. vulgatus* mpk-stimulierte B-Zellen ab einer fünffachen Zellzahl gegenüber den T-Zellen ebenfalls inhibitorisch wirken. Bereits in Kapitel 0 des Ergebnisteils wurde ausgeführt, dass *B. vulgatus* mpk zwar keine signifikante, aber doch tendenziell höhere IL-10-Produktion in B-Zellen induziert als unstimulierte Kontrollen. Über den langen Zeitraum und durch die hohe Zellzahl wäre eine IL-10-Akkumulation also möglich.

Die Tatsache, dass die T-Zell-Proliferation in Proben mit Anti-Interleukin-10-Antikörper am geringsten ist, könnte bedeuten, dass der Antikörper möglicherweise direkt an den T-Zellen wirkt und diese hemmt. Eigentlich war die Erwartung, dass durch die Zugabe dieses Antikörpers die Proliferation der

T-Zellen weniger stark inhibiert wird, weil sie so von dem B<sub>reg</sub>-produzierten IL-10 unbeeinflusst bleiben.

Unabhängig von IL-10 besitzen B<sub>regs</sub> aber auch andere Mechanismen, um T-Zell-Populationen zu inhibieren. Tian et al. (2001) zeigten in ihrem Diabetes-Maus-Modell, dass LPS-aktivierte B-Zellen über den von uns ebenfalls schon nachgewiesenen Fas-Liganden Apoptose in diabetogenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen auslösen konnten. Ähnliches stellten auch Lundy and Boros (2002) bei Schistosomiasis-assoziierten Granulomen fest.

Insgesamt sind *E. coli* mpk-Bakterien also in der Lage, B<sub>reg</sub>-vermittelt die T-Zell-Antwort quantitativ zu verringern. Da für die Art der Immunantwort aber nicht allein die Zellzahlen der Effektorzellen entscheidend sind, sondern vor allem deren Phänotyp, wurde die von vorstimulierten B-Zellen aktivierte T-Zellpopulation auf Subtypen untersucht. Hypothese war, dass die durch *E. coli* mpk induzierten regulatorischen B-Zellen eine vorwiegend anti-inflammatorische Polarisation der T-Zellen hervorrufen. In diesem Zusammenhang wurde erwartet, dass auch immunogenere Mikrobiotabestandteile, wie der Pathobiont *E. coli* mpk, Toleranz erzeugen können, da sie trotz potenzieller Pathogenität als wichtige Bestandteile im intestinalen Mikrobioms vorkommen.

Die erste Beobachtung, dass in *E. coli* mpk-stimulierten Proben signifikant weniger der naiven T-Zellen in Richtung Th1-Zellen differenzierten, deckt sich mit der initialen Arbeitshypothese. Th1-Zellen werden über ihr Zytokinprofil mit IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und IL-4<sup>-</sup> charakterisiert, initiieren die Abwehr von intrazellulären Pathogenen und werden gemeinsam mit Th17-Zellen bei abnormer Aktivierung häufig in Verbindung mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, wie Rheumatoider Arthritis und Multipler Sklerose, gebracht (Luger et al., 2008). Auch die Gruppe um Tian et al. (2001) untersuchte die Herabregulation der Th1-Immunität durch LPS-aktivierte B-Zellen und kam im NOD-Mausmodell zu dem Ergebnis, dass aktivierte B-Zellen Th1-Zellen in die Apoptose treiben. Dadurch können diese nicht mehr ihre Rolle in der Krankheitsbeförderung bei Diabetes ausführen.

Th2-Zellen, die sich vor allem über die Zytokine IL-4 und IL-5 auszeichnen, wird zum einen die Induktion der humoralen Immunantwort, also insbesondere der Antikörperproduktion, als auch eine entscheidende Rolle bei allergischen Geschehen zugesprochen. Andererseits konnten Gimsa et al. (2001) auch die Förderung anti-inflammatorischer Prozesse im Rahmen von EAE nachweisen. Darauf basierend könnte also auch der in unserer Arbeit gemessene signifikante Anstieg von Th2-Zellen durch *E. coli* mpk-Stimulation als immunmodulatorisch gewertet werden. Kritisch muss aber der sehr geringe prozentuale Anteil der Th2-Zellen von 0,5-3 % gesehen werden, dessen biologische Signifikanz wiederum fraglich ist.

Es gibt in Fachkreisen schon erste Überlegungen, wie eine Veränderung des Th1/Th2-Verhältnisses von therapeutischem Nutzen sein könnte. Im Prinzip gilt dabei jedes Mal der gleiche Ansatz: Krankheiten, die vorwiegend durch den einen Th-Typ hervorgerufen oder am Laufen gehalten werden, sollen durch Hemmung desselben bzw. Förderung des anderen Typs behandelt werden. Beispielsweise haben Herold et al. (2002) durch Inhibition Th1-spezifischer Zytokine die Krankheitsaktivität der Autoimmunerkrankung Diabetes Typ 1 vermindert. Umgekehrt könnte die Stimulation gerade der Th1-vermittelten Immunantwort durch Hitzeschock-Proteine eine Option für die Krebstherapie sein (Hoos and Levey, 2003).

Ein ähnliches Experiment, wie der hier durchgeführte T-Zell-Proliferationsassay, mit vorstimulierten B-Zellen wurde auch schon 2010 durchgeführt (Round and Mazmanian), wobei keimfreie Mäuse *in vivo* mit dem Symbionten *Bacteroides fragilis* kolonisiert wurden. Dabei konnten die Autoren zeigen, dass besonders viele Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen entwickelt wurden, die IL-10 produzierten. Zudem konnte auch unsere Beobachtung bezüglich der TLR2-Relevanz für die B-Zell-Stimulation für T-Zellen in gleicher Weise bestätigt werden. Auch Kessel et al. (2012) konnten eine B<sub>reg</sub>-induzierte Foxp3-Erhöhung in T<sub>regs</sub> nachweisen.

Th17-Zellen sind durch ihre Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-17A bekannt und bewirken in ihrer physiologischen Rolle in Maus und Mensch vornehmlich eine Immunität gegen Viren, Pilze und andere opportunistische

Infektionen (vgl. Crome et al., 2010, Tesmer et al., 2008). Dafür interagieren sie mit Endothelzellen, rekrutieren Granulozyten und beeinflussen in einer noch nicht abschließend verstandenen Art und Weise die Funktion von B- und T-Zellen.

In einem dysregulierten Immunsystem spielen Th17-Zellen zudem laut einiger Studien eine krankheitsfördernde Rolle in Autoimmunkrankheiten, wie dem Systemischen Lupus Erythematoses (vgl. Dolff et al., 2011, Talaat et al., 2015), der Multiplen Sklerose und entzündlichen Darmerkrankungen (vgl. Crome et al., 2010, Monteleone et al., 2009).

Die Tatsache, dass in unseren Experimenten durch Aktivierung der T-Zellen mit großen Anteilen an B<sub>regs</sub> (zumindest in *E. coli* mpk-stimulierten Proben) trotzdem signifikant mehr Th17-Zellen als bspw. nach *B. vulgatus* mpk-Stimulation oder ohne Stimulation entstanden, kann bedeuten, dass die regulatorischen B-Zellen nicht in der Lage waren, die durch die *E. coli* mpk-Stimulation ebenfalls entstandenen pro-inflammatorischen B-Effektorzellen in ihrer Wirkung zu übertreffen. Dies passt auch zu den Eigenschaften eines Pathobionten, der sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte der Immunantwort hervorruft und in einem fein justierten Gleichgewicht seine eigene Toleranz durch Gegenregulation der Immunabwehr gewährleistet. Zudem wird in den letzten Jahren eine Gewebe-protective Funktion von Th17-Zellen diskutiert, die den Th17-Zellen auch eine anti-inflammatorische Wirkung attestieren würde (Geremia et al., 2014, Hueber et al., 2012).

Cai et al. (2012) zeigten einen weiteren Mechanismus auf, über den die Pathobionten ihre eigene Immunaktivierung begrenzen können. Die Gruppe wies nach, dass die Helfer-Fähigkeit von Tfh-(T-follikulären Helfer-)Zellen unter IL-10-Einfluss gegenüber B-Zellen reduziert ist. Somit spielt abgesehen von der Anzahl jedes Zelltyps auch deren Funktionalität eine Rolle, die bspw. durch lösliche Botenstoffe moduliert werden kann.

Die interessanteste Vorarbeit zur immunmodulatorischen Wirkung von Pathobionten stammt von Chow and Mazmanian (2010). Die Gruppe vermutete einen immunregulatorischen Effekt von T6SS, einem am Sekretionssystem von

Bakterien beteiligten Membranprotein, und beobachtete in Zell- und Gewebekulturen die Reaktion von T-Zellen auf T6SS-mutierten *Helicobacter hepaticus* gegenüber dem Wildtyp. *H. hepaticus* ist ähnlich wie *E. coli* mpk ein Pathobiont, der den gesunden Darm lange Zeit ohne Krankheitswert kolonisieren kann, aber im immungeschwächten Zustand u. a. zur Darmentzündung führt. T6SS kommt auch in anderen Bakterienspezies vor, darunter auch *E. coli*, allerdings wurde ihm bisher nur die Funktion als Virulenzfaktor zugeschrieben (Dudley et al., 2006). Die Wildtyp-*H. hepaticus*-Ergebnisse der Chow-Studie zeigen deutliche Parallelen zu den gewonnenen Erkenntnissen mit *E. coli* mpk und *E. coli* mpk-induzierten B<sub>regs</sub>: Es kommt zur Suppression der T-Zellen und zur verminderten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$ . Allerdings beobachtete die Gruppe auch geringere IL-17-Mengen, das bei uns durch *E. coli* mpk eher erhöht war. Beim Vergleich der Daten muss aber darauf hingewiesen werden, dass die *E. coli* mpk-Effekte mit den Effekten des Symbionten *B. vulgatus* mpk verglichen wurden. Die *H. hepaticus*-Ergebnisse entstanden durch die Gegenüberstellung der pathogenen T6SS-Mutante und des pathobiontischen Wildtyps. Trotzdem zeigt die Interpretation der Daten, dass beide Pathobionten in der Lage sind, ein anti-inflammatorisches Milieu zu begünstigen und die T-Zellantwort zu hemmen, um als Kommensale im Mikrobiom toleriert zu werden.

Der B<sub>reg</sub>-vermittelte Einfluss auf pro-inflammatorische T-Zellen ist dabei klinisch besonders relevant. T-Zellen sind mit ihrer Zytotoxizität verantwortlich für Autoimmunität und Transplantatabstoßungen. Die therapeutische Induktion von B<sub>regs</sub> könnte daher über eine körpereigene Immunsuppression eine Alternative zur relativ undifferenzierten bisher praktizierten Immunsuppression bspw. durch ungezielte B-Zell-Depletion sein.

Lal et al. (2016) und Moreau et al. (2015) zeigten, dass der Transfer von *marginal zone precursor* B-Zellen und *transitional-2* B-Zellen das Überleben transplantierte Mäuse verbessern konnte. Grund dafür war unter anderem die Kontrolle der T-Zell-Differenzierung von T-Helferzellen-Typ-17, folliculären T-Helferzellen und folliculären regulatorischen T-Zellen.

Andere Untersuchungen bestätigten bereits, dass IL-10-produzierende B<sub>regs</sub> erfolgreich *ex vivo* gezüchtet werden konnten und anschließend immunsuppressive Eigenschaften aufwiesen (Rafei et al., 2009). Auch in Patienten konnten schon B<sub>regs</sub> vermehrt werden, die in der Lage waren, T-Zell-Autoimmunität zu unterdrücken (Yoshizaki et al., 2012). Trotzdem gibt es nach wie vor keine etablierten Therapien auf der Basis von regulatorischen B-Zellen.

Gleichzeitig könnte die gezielte Depletion der B<sub>reg</sub>-Population ein Therapieansatz bei Krebserkrankungen sein, da auch Tumore zur Immunevasion B<sub>reg</sub>-vermittelte Mechanismen nutzen (Zhang et al., 2015).

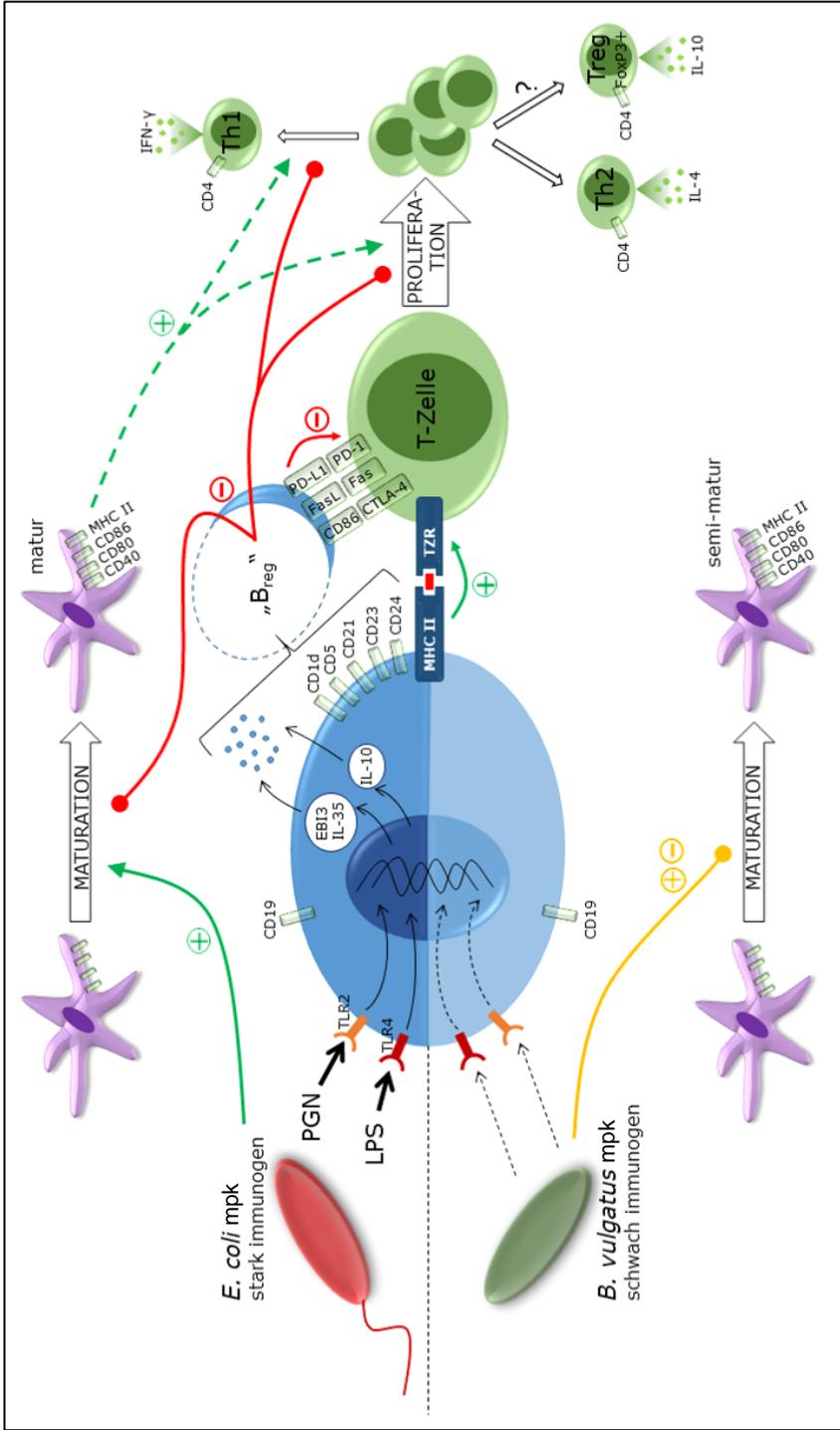


Abbildung 19. Tolerogene Effekte des Pathobionten *E. coli* mpk werden über *Bregs* vermittelt. Schematische Übersicht über die Erkenntnisse der experimentellen Arbeit. Direkt gegenübergestellt werden die Effekte von *E. coli* mpk und *B. vulgatus* mpk auf B-Zellen und dendritische Zellen, sowie indirekt auf T-Zellen über die *E. coli* mpk-vermittelte *Breg*-Induktion. Grüne Pfeile zeigen die Stimulation eines Prozesses, rote Linien mit Punkt deren Inhibition. Die gelbe Linie mit Punkt symbolisiert eine teilweise Stimulation. Violette Zellen sind dendritische Zellen. Diese Abbildung wurde bereits in abgewandelter Form veröffentlicht (Maerz et al., 2020, CC BY 4.0).

CD = Cluster of differentiation, CTLA-4 = Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4, EB1 = Epstein-Barr virus induced gene 3, Fas-L = First apoptosis signal ligand, IFN = Interferon, IL = Interleukin, LPS = Lipopolysaccharide, MHC = major histocompatibility complex, PD-1-L = programmed death protein ligand, PGN = Peptidoglykane, TLR = Toll like Rezeptoren, TZR = T-Zell-Rezeptor

#### **4.2.4 Ausblick**

In dieser Arbeit wurden die mpk-Stämme der beiden Bakterienspezies verwendet, die im Max-von-Pettenkofer-Institut aus gesunden Labormäusen isoliert wurden. Zwar existieren die Spezies *B. vulgatus* und *E. coli* auch im menschlichen Darm. Ob die Eigenschaften der humanen Stämme allerdings mit den mpk-Stämmen exakt übereinstimmen, ist noch nicht ausreichend bekannt. Da hier nur der Vergleich zwischen dem Symbionten *B. vulgatus* mpk und dem Pathobionten *E. coli* mpk angestellt wurde, wäre es zur eindeutigen Abgrenzung zum Pathogen sinnvoll, die Experimente in ähnlichem Stil mit *E. coli* mpk und einem Pathogen zu wiederholen. Weiterführend sollten auch In-vivo-Versuche in Mäusen durchgeführt werden, um die gewonnenen Erkenntnisse in der Umgebung eines hochkomplexen Organismus mit zahlreichen weiteren Einflussfaktoren zu bestätigen. Dabei ist es besonders entscheidend herauszufinden, welche weiteren Symbiosefaktoren existieren, die protektive Immunreaktionen hervorrufen können, und von welchen Bakterienspezies sie produziert oder induziert werden.

Besonders interessant für die zukünftige Therapie von (autoimmunen) Darmerkrankungen wäre zudem die Analyse und Forschung mit Bakterienstämmen, die aus diesen Patienten isoliert wurden. Möglicherweise unterscheidet sich die Mikrobiomzusammensetzung der Patienten nicht von Gesunden, die Eigenschaften der individuellen Stämme aber schon. So könnten Pathobionten durch Mutationen oder horizontalen Gentransfer ihre immunmodulatorischen Eigenschaften verloren haben und so Autoimmunität in einem dysregulierten Immunsystem begünstigen. Daher wäre es sicher vielversprechend, die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit Patientenstämmen zu wiederholen und zu vergleichen.

Trotzdem trägt auch diese Arbeit schon zu einem besseren Verständnis der regulatorischen Wege bei, die Pathobionten zur Erzeugung von Toleranz induzieren. Die Kenntnis der Kettenreaktion regulatorischer Prozesse könnte in der Zukunft auch der genaueren Diagnostik bei Autoimmunerkrankungen dienen, um bei Autoimmunpatienten individuell die Ursache ihrer gestörten

Homöostase festzustellen. Gibt es bestimmte Mikrobiomzusammensetzungen, die für entzündliche Erkrankungen prädisponieren? Lässt diese sich durch Ernährung, Medikamente und Hygieneverhalten nachhaltig beeinflussen? Ist ein Defekt im System der Immunzellen, bspw.  $B_{reg}$ , nachzuweisen? Im Rahmen der personalisierten Medizin ließen sich daraus möglicherweise individuelle Ansatzpunkte für therapeutische Maßnahmen finden, wie bspw. der adoptive  $B_{reg}$ -Transfer ganz bestimmter  $B_{reg}$ -Subtypen oder die gezielte Stimulation/Inhibierung verschiedener T-Helferzellen.

Des Weiteren wird in dieser Arbeit die Bedeutung des Mikrobioms und seiner Einzelkomponenten für die Homöostase des Immunsystems deutlich (vgl. auch Maerz et al., 2020). Besonders während der Immunentwicklung im Kindesalter könnte daher eine Beeinflussung der Mikrobiotazusammensetzung eine Stellschraube für die Prävention von Autoimmunerkrankungen darstellen, da die meisten Autoimmunerkrankungen schon in sehr jungen Jahren auftreten.

Eine besondere Schwierigkeit bei diesem Ansatz ist allerdings, dass bisher noch unklar ist, ob die Dysbiose, also die Störung der bakteriellen Darmflora, Ursache oder Symptom einer Erkrankung ist.

Nichtsdestotrotz nehmen die Hinweise und Belege, dass vom Mikrobiom entscheidende Effekte auf das Immunsystem ausgeübt werden, immer mehr zu und es gilt, die Mechanismen dahinter genauer zu erforschen. Die dabei erlangten Ergebnisse werden nicht nur in der Therapie verschiedenster Erkrankungen Erfolge bewirken, sondern auch in der aktiven Unterstützung von Gesundheit relevant sein (Round and Mazmanian, 2009).

## 5 Zusammenfassung

Die Fähigkeit des Immunsystems, ein Gleichgewicht aus entzündungsfördernden und –hemmenden Mechanismen aufrecht zu erhalten ist unabdingbar. Einerseits muss der Organismus mit einer kräftigen Immunreaktion vor Infektionen geschützt werden, andererseits muss diese auch rechtzeitig beendet oder sogar unterbunden werden, wenn es sich um harmlose oder körpereigene Antigenstrukturen handelt. Andernfalls kommt es zu Autoimmunerkrankungen und Allergien, die weltweit eine steigende Prävalenz zeigen. Welchen Einfluss Symbionten und Pathobionten des intestinalen Mikrobioms auf die Immunhomöostase haben und inwieweit sie die Induktion regulatorischer B-Zellen nutzen, um Toleranz zu erzeugen, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Immunzellen wurden dafür mittels MACS aus C57BL/6NCrI-Mäusen isoliert und mit dem Pathobionten *E. coli* mpk sowie dem Symbionten *B. vulgatus* mpk stimuliert. Die Untersuchung der murinen Immunzellphänotypen nach der Zellkultur erfolgte mittels Durchflusszytometrie für die zellgebundenen Marker und mittels ELISA für lösliche Moleküle.

Es konnte beobachtet werden, dass eine Stimulation von B-Zellen mit dem Pathobionten *E. coli* mpk Toll-like-Rezeptor-2/4-abhängig zur Entwicklung von IL-10-produzierenden B10-Zellen, Tim-1<sup>+</sup>-Zellen und T2-MZP-Zellen führt, die alle zu den B<sub>reg</sub>-Subtypen zählen. Zudem exprimierten auf diese Weise aktivierte B-Zellen vermehrt weitere regulatorische Moleküle wie FasL, GitrL, PD-1-L, Ebi3, CD73 und den IL-10-Rezeptor. Diese induzierten B<sub>regs</sub> inhibierten wiederum die Maturation antigenpräsentierender dendritischer Zellen und deren Sekretion von pro-inflammatorischem TNF- $\alpha$ . Außerdem wurde B<sub>reg</sub>-vermittelt die Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie ihre Polarisation zu pro-inflammatorischen Th1-Zellen unterdrückt. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals versucht, die Komplexität des Zusammenspiels unterschiedlicher Immunzellen in vitro nachzustellen. Dafür wurden verschiedene Zwei- bis Dreifachkulturen aus B-, T- und dendritischen Zellen etabliert.

In der Zusammenschau lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die Lipopolysaccharid- und Peptidoglykanstrukturen von *E. coli* mpk über TLR 2/4

auf B-Zellen einen Signalweg in Gang setzen, der durch die Entwicklung von regulatorischen B-Zellen Toleranz erzeugt. Die tolerogenen Mechanismen reichen von anti-inflammatorischen Botenstoffen (IL-10, IL-35), über APZ-Maturationshemmung bis zur Suppression von T-Zellen. Diese humoralen und zellulären Prozesse nutzt *E. coli* mpk als Gegenregulation zu seinen pro-inflammatorischen Eigenschaften, um als Kommensale im intestinalen Mikrobiom toleriert zu werden. Aber auch das Immunsystem des Wirts ist auf die mikrobiellen Stimuli angewiesen, da sie zur Immunhomöostase zwischen pro- und anti-inflammatorischen Kräften beitragen und somit Autoimmunerkrankungen und Allergien entgegenwirken. Diese Erkenntnis kann im klinischen Alltag von größter Wichtigkeit sein, da die Modulation der B<sub>reg</sub>-Funktion und die Bedeutung des Mikrobioms dabei zu neuen Therapieansätzen bei diesen Erkrankungen führt. Weitere mögliche Anwendungsgebiete sind die Immunsuppression nach allogener Transplantation und die Unterbindung von Immunevasionsmechanismen bei Krebs. Da bisher nahezu alle Studien zu diesen Themen in Zellkulturen oder im Mausmodell stattfanden, gilt natürlich die Limitation, dass die daraus gewonnenen Ergebnisse kritisch auf ihre Übertragbarkeit auf den Menschen hinterfragt werden müssen. Zwar wurden bereits einige der B<sub>reg</sub>-Subtypen in ähnlicher Form im Menschen nachgewiesen und auch die wichtigsten Zytokine stimmen überein, trotzdem fehlt es an weiteren Vergleichsstudien zwischen Mensch und Maus.

Dieses Projekt stellt einen Baustein zur Entschlüsselung der komplexen Interaktionen zwischen verschiedenen Akteuren des Immunsystems dar. Es schlägt den Bogen zum intestinalen Mikrobiom und zeigt, dass auch Darmbakterien einen Einfluss auf die Immunhomöostase und somit auf systemische Prozesse im Rahmen von Gesundheit und Krankheit im Körper ausüben.

## Literaturverzeichnis:

- AKDIS, M., AAB, A., ALTUNBULAKLI, C., AZKUR, K., COSTA, R. A., CRAMERI, R., DUAN, S., EIWEGGER, T., ELJASZEWICZ, A. & FERSTL, R. 2016. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor  $\beta$ , and TNF- $\alpha$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138, 984-1010.
- AKIRA, S., UEMATSU, S. & TAKEUCHI, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- ANDERSON, M. S. & BLUESTONE, J. A. 2005. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 447-485.
- ARAVENA, O., FERRIER, A., MENON, M., MAURI, C., AGUILLON, J. C., SOTO, L. & CATALAN, D. 2017. TIM-1 defines a human regulatory B cell population that is altered in frequency and function in systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther*, 19, 8.
- BARR, T. A., SHEN, P., BROWN, S., LAMPROPOULOU, V., ROCH, T., LAWRIE, S., FAN, B., O'CONNOR, R. A., ANDERTON, S. M. & BAROR, A. 2012. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *Journal of Experimental Medicine*, 209, 1001-1010.
- BEMARK, M., BOYSEN, P. & LYCKE, N. Y. 2012. Induction of gut IgA production through T cell-dependent and T cell-independent pathways. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1247, 97-116.
- BERER, K., GERDES, L. A., CEKANAVICIUTE, E., JIA, X., XIAO, L., XIA, Z., LIU, C., KLOTZ, L., STAUFFER, U., BARANZINI, S. E., KUMPFEL, T., HOHLFELD, R., KRISHNAMOORTHY, G. & WEKERLE, H. 2017. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 10719-10724.
- BETTELLI, E., CARRIER, Y., GAO, W., KORN, T., STROM, T. B., OUKKA, M., WEINER, H. L. & KUCHROO, V. K. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441, 235-8.
- BETTELLI, E., PRABHU DAS, M., HOWARD, E. D., WEINER, H. L., SOBEL, R. A. & KUCHROO, V. K. 1998. IL-10 Is Critical in the Regulation of Autoimmune Encephalomyelitis as Demonstrated by Studies of IL-10- and IL-4-Deficient and Transgenic Mice. *The Journal of Immunology*, 161, 3299-3306.
- BHATTACHARYYA, S., SEN, P., WALLET, M., LONG, B., BALDWIN, A. S. & TISCH, R. 2004. Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of I $\kappa$ B kinase activity. *Blood*, 104, 1100-1109.
- BLAIR, P. A., CHAVEZ-RUEDA, K. A., EVANS, J. G., SHLOMCHIK, M. J., EDDAOUDI, A., ISENBERG, D. A., EHRENSTEIN, M. R. & MAURI, C. 2009. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B

- cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *The Journal of Immunology*, 182, 3492-3502.
- BODHANKAR, S., VANDENBARK, A. A. & OFFNER, H. 2012. Oestrogen treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis requires 17beta-oestradiol-receptor-positive B cells that up-regulate PD-1 on CD4+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunology*, 137, 282-93.
- BOHME, J., ROSSNAGEL, C., JACOBS, T., BEHRENDTS, J., HOLSCHEER, C. & ERDMANN, H. 2016. Epstein-Barr virus-induced gene 3 suppresses T helper type 1, type 17 and type 2 immune responses after *Trypanosoma cruzi* infection and inhibits parasite replication by interfering with alternative macrophage activation. *Immunology*, 147, 338-48.
- BRIX, S., LUND, P., KJAER, T. M., STRAARUP, E. M., HELLGREN, L. I. & FROKIAER, H. 2010. CD4(+) T-cell activation is differentially modulated by bacteria-primed dendritic cells, but is generally down-regulated by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Immunology*, 129, 338-50.
- CAI, G., NIE, X., ZHANG, W., WU, B., LIN, J., WANG, H., JIANG, C. & SHEN, Q. 2012. A regulatory role for IL-10 receptor signaling in development and B cell help of T follicular helper cells in mice. *J Immunol*, 189, 1294-302.
- CANTAREL, B. L., WAUBANT, E., CHEHOUD, C., KUCZYNSKI, J., DESANTIS, T. Z., WARRINGTON, J., VENKATESAN, A., FRASER, C. M. & MOWRY, E. M. 2015. Gut microbiota in multiple sclerosis: possible influence of immunomodulators. *J Investig Med*, 63, 729-34.
- CARTER, N. A., VASCONCELLOS, R., ROSSER, E. C., TULONE, C., MUÑOZ-SUANO, A., KAMANAKA, M., EHRENSTEIN, M. R., FLAVELL, R. A. & MAURI, C. 2011. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 1100284.
- CASADEVALL, A. & PIROFSKI, L.-A. 2000. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infection and immunity*, 68, 6511-6518.
- CAUX, C., MASSACRIER, C., VANBERVLIET, B., DUBOIS, B., VAN KOOTEN, C., DURAND, I. & BANCHEREAU, J. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *Journal of Experimental Medicine*, 180, 1263-1272.
- CHAIRATANA, P. & NOLAN, E. M. 2017. Defensins, lectins, mucins, and secretory immunoglobulin A: microbe-binding biomolecules that contribute to mucosal immunity in the human gut. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 52, 45-56.
- CHEHBOUN, S., LABRECQUE-CARBONNEAU, J., PASQUIN, S., MELIANI, Y., MEDDAH, B., FERLIN, W., SHARMA, M., TORMO, A., MASSON, J. F. & GAUCHAT, J. F. 2017. Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3) can mediate IL-6 trans-signaling. *J Biol Chem*, 292, 6644-6656.
- CHEN, Q., BA, Y., ZHOU, M., LI, S. & ZHANG, P. 2018. CD23 on B cells determines Breg-facilitated IL-10 secretion as well as activation of T cells. *Lin chuang er bi yan hou tou jing wai ke za zhi= Journal of clinical otorhinolaryngology, head, and neck surgery*, 32, 931.

- CHOW, J. & MAZMANIAN, S. K. 2010. A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. *Cell host & microbe*, 7, 265-276.
- COUPER, K. N., BLOUNT, D. G. & RILEY, E. M. 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*, 180, 5771-7.
- COYNE, M. J., ZITOMERSKY, N. L., MCGUIRE, A. M., EARL, A. M. & COMSTOCK, L. E. 2014. Evidence of extensive DNA transfer between bacteroidales species within the human gut. *MBio*, 5, e01305-14.
- CROME, S., WANG, A. & LEVINGS, M. 2010. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 159, 109-119.
- CURNOW, S. J., SCHEEL-TOELLNER, D., JENKINSON, W., RAZA, K., DURRANI, O. M., FAINT, J. M., RAUZ, S., WLOKA, K., PILLING, D., ROSE-JOHN, S., BUCKLEY, C. D., MURRAY, P. I. & SALMON, M. 2004. Inhibition of T cell apoptosis in the aqueous humor of patients with uveitis by IL-6/soluble IL-6 receptor trans-signaling. *J Immunol*, 173, 5290-7.
- DASS, S., VITAL, E. M. & EMERY, P. 2007. Development of psoriasis after B cell depletion with rituximab. *Arthritis & Rheumatism*, 56, 2715-2718.
- DAVIDSON, A. & DIAMOND, B. 2001. Autoimmune diseases. *New England Journal of Medicine*, 345, 340-350.
- DE SMEDT, T., VAN MECHELEN, M., DE BECKER, G., URBAIN, J., LEO, O. & MOSER, M. 1997. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *European journal of immunology*, 27, 1229-1235.
- DIEHL, S. & RINCON, M. 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol*, 39, 531-6.
- DILILLO, D. J., MATSUSHITA, T. & TEDDER, T. F. 2010. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1183, 38-57.
- DING, Q., YEUNG, M., CAMIRAND, G., ZENG, Q., AKIBA, H., YAGITA, H., CHALASANI, G., SAYEGH, M. H., NAJAFIAN, N. & ROTHSTEIN, D. M. 2011. Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *The Journal of clinical investigation*, 121.
- DOGAN, I., BERTOCCI, B., VILMONT, V., DELBOS, F., MÉGRET, J., STORCK, S., REYNAUD, C.-A. & WEILL, J.-C. 2009. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nature immunology*, 10, 1292.
- DOLFF, S., BIJL, M., HUITEMA, M. G., LIMBURG, P. C., KALLENBERG, C. G. & ABDULAHAD, W. H. 2011. Disturbed Th1, Th2, Th17 and T(reg) balance in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*, 141, 197-204.
- DUDDY, M., NIINO, M., ADATIA, F., HEBERT, S., FREEDMAN, M., ATKINS, H., KIM, H. J. & BAR-OR, A. 2007. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *The Journal of Immunology*, 178, 6092-6099.

- DUDLEY, E. G., THOMSON, N. R., PARKHILL, J., MORIN, N. P. & NATARO, J. P. 2006. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 61, 1267-1282.
- ERRIDGE, C., BENNETT-GUERRERO, E. & POXTON, I. R. 2002. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect*, 4, 837-51.
- EVANS, J. G., CHAVEZ-RUEDA, K. A., EDDAOUDI, A., MEYER-BAHLBURG, A., RAWLINGS, D. J., EHRENSTEIN, M. R. & MAURI, C. 2007. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol*, 178, 7868-78.
- FANTINI, M. C., RIZZO, A., FINA, D., CARUSO, R., SARRA, M., STOLFI, C., BECKER, C., MACDONALD, T. T., PALLONE, F. & NEURATH, M. F. 2009. Smad7 controls resistance of colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated suppression. *Gastroenterology*, 136, 1308-1316. e3.
- FILLATREAU, S., SWEENIE, C. H., MCGEACHY, M. J., GRAY, D. & ANDERTON, S. M. 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature Immunology*, 3, 944.
- FRANCISCO, L. M., SALINAS, V. H., BROWN, K. E., VANGURI, V. K., FREEMAN, G. J., KUCHROO, V. K. & SHARPE, A. H. 2009. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 206, 3015-3029.
- FRANKE, A., MCGOVERN, D. P., BARRETT, J. C., WANG, K., RADFORD-SMITH, G. L., AHMAD, T., LEES, C. W., BALSCHUN, T., LEE, J. & ROBERTS, R. 2010. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nature genetics*, 42, 1118.
- FRICK, J.-S., GRÜNEBACH, F. & AUTENRIETH, I. B. 2010. Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 19-24.
- FRICK, J. S., ZAHIR, N., MULLER, M., KAHL, F., BECHTOLD, O., LUTZ, M. B., KIRSCHNING, C. J., REIMANN, J., JILGE, B., BOHN, E. & AUTENRIETH, I. B. 2006. Colitogenic and non-colitogenic commensal bacteria differentially trigger DC maturation and Th cell polarization: an important role for IL-6. *Eur J Immunol*, 36, 1537-47.
- GEREMIA, A., BIANCHERI, P., ALLAN, P., CORAZZA, G. R. & DI SABATINO, A. 2014. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity reviews*, 13, 3-10.
- GIES, V., SCHICKEL, J. N., JUNG, S., JOUBLIN, A., GLAUZY, S., KNAPP, A. M., SOLEY, A., POINDRON, V., GUFFROY, A., CHOI, J. Y., GOTTENBERG, J. E., ANOLIK, J. H., MARTIN, T., SOULAS-SPRAUEL, P., MEFFRE, E. & KORGANOW, A. S. 2018. Impaired TLR9 responses in B cells from patients with systemic lupus erythematosus. *JCI Insight*, 3.
- GILL, S. R., POP, M., DEBOY, R. T., ECKBURG, P. B., TURNBAUGH, P. J., SAMUEL, B. S., GORDON, J. I., RELMAN, D. A., FRASER-LIGGETT, C. M. & NELSON, K. E. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312, 1355-9.

- GIMSA, U., WOLF, S. A., HAAS, D., BECHMANN, I. & NITSCH, R. 2001. Th2 cells support intrinsic anti-inflammatory properties of the brain. *J Neuroimmunol*, 119, 73-80.
- GOETZ, M., ATREYA, R., GHALIBAFIAN, M., GALLE, P. R. & NEURATH, M. F. 2007. Exacerbation of ulcerative colitis after rituximab salvage therapy. *Inflammatory bowel diseases*, 13, 1365-1368.
- HAAG, L.-M. & SIEGMUND, B. 2015. Intestinal microbiota and the innate immune system—a crosstalk in Crohn’s disease pathogenesis. *Frontiers in immunology*, 6, 489.
- HAMANN, D., BAARS, P. A., REP, M. H., HOOIBRINK, B., KERKHOF-GARDE, S. R., KLEIN, M. R. & VAN LIER, R. A. 1997. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 186, 1407-1418.
- HASHIMOTO, M., KIRIKAE, F., DOHI, T., ADACHI, S., KUSUMOTO, S., SUDA, Y., FUJITA, T., NAOKI, H. & KIRIKAE, T. 2002. Structural study on lipid A and the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide from a clinical isolate of *Bacteroides vulgatus* from a patient with Crohn’s disease. *Eur J Biochem*, 269, 3715-21.
- HAYASHI, F., SMITH, K. D., OZINSKY, A., HAWN, T. R., EUGENE, C. Y., GOODLETT, D. R., ENG, J. K., AKIRA, S., UNDERHILL, D. M. & ADEREM, A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410, 1099.
- HEINE, G., DROZDENKO, G., GRUN, J. R., CHANG, H. D., RADBRUCH, A. & WORM, M. 2014. Autocrine IL-10 promotes human B-cell differentiation into IgM- or IgG-secreting plasmablasts. *Eur J Immunol*, 44, 1615-21.
- HEROLD, K. C., HAGOPIAN, W., AUGER, J. A., POUMIAN-RUIZ, E., TAYLOR, L., DONALDSON, D., GITELMAN, S. E., HARLAN, D. M., XU, D., ZIVIN, R. A. & BLUESTONE, J. A. 2002. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 346, 1692-8.
- HERZER, P. J., INOUE, S., INOUE, M. & WHITTAM, T. S. 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 172, 6175-6181.
- HIROTANI, M., NIINO, M., FUKAZAWA, T., KIKUCHI, S., YABE, I., HAMADA, S., TAJIMA, Y. & SASAKI, H. 2010. Decreased IL-10 production mediated by Toll-like receptor 9 in B cells in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 221, 95-100.
- HOLLISTER, E. B., RIEHLE, K., LUNA, R. A., WEIDLER, E. M., RUBIO-GONZALES, M., MISTRETTA, T.-A., RAZA, S., DODDAPANENI, H. V., METCALF, G. A. & MUZNY, D. M. 2015. Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome*, 3, 36.
- HOOS, A. & LEVEY, D. L. 2003. Vaccination with heat shock protein-peptide complexes: from basic science to clinical applications. *Expert Rev Vaccines*, 2, 369-79.
- HORI, S., NOMURA, T. & SAKAGUCHI, S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299, 1057-1061.

- HUEBER, W., SANDS, B. E., LEWITZKY, S., VANDEMEULEBROECKE, M., REINISCH, W., HIGGINS, P. D., WEHKAMP, J., FEAGAN, B. G., YAO, M. D. & KARCZEWSKI, M. 2012. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut*, 61, 1693-1700.
- IWATA, Y., MATSUSHITA, T., HORIKAWA, M., DILILLO, D. J., YANABA, K., VENTURI, G. M., SZABOLCS, P. M., BERNSTEIN, S. H., MAGRO, C. M. & WILLIAMS, A. D. 2011. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, 117, 530-541.
- JANEWAY, C. A., JR. & MEDZHITOV, R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216.
- KAKU, H., CHENG, K. F., AL-ABED, Y. & ROTHSTEIN, T. L. 2014. A novel mechanism of B cell-mediated immune suppression through CD73 expression and adenosine production. *J Immunol*, 193, 5904-13.
- KALAMPOKIS, I., YOSHIZAKI, A. & TEDDER, T. F. 2013. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis research & therapy*, 15, S1.
- KANE, L. P. 2010. T cell Ig and mucin domain proteins and immunity. *The Journal of Immunology*, 184, 2743-2749.
- KELSALL, B. 2008. Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages. *Mucosal immunology*, 1, 460.
- KESSEL, A., HAJ, T., PERI, R., SNIR, A., MELAMED, D., SABO, E. & TOUBI, E. 2012. Human CD19(+)/CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun Rev*, 11, 670-7.
- KNIPPENBERG, S., PEELEN, E., SMOLDERS, J., THEWISSEN, M., MENHEERE, P., TERVAERT, J. W. C., HUPPERTS, R. & DAMOISEAUX, J. 2011. Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naive/memory Breg ratio during a relapse but not in remission. *Journal of neuroimmunology*, 239, 80-86.
- KUCHROO, V. K., UMETSU, D. T., DEKRUYFF, R. H. & FREEMAN, G. J. 2003. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*, 3, 454-62.
- LAL, G., KULKARNI, N., NAKAYAMA, Y., SINGH, A. K., SETHI, A., BURRELL, B. E., BRINKMAN, C. C., IWAMI, D., ZHANG, T. & HEHLGANS, T. 2016. IL-10 from marginal zone precursor B cells controls the differentiation of Th17, Tfh and Tfr cells in transplantation tolerance. *Immunology letters*, 170, 52-63.
- LAMPROPOULOU, V., HOEHLIG, K., ROCH, T., NEVES, P., GÓMEZ, E. C., SWEENIE, C. H., HAO, Y., FREITAS, A. A., STEINHOFF, U. & ANDERTON, S. M. 2008. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *The Journal of Immunology*, 180, 4763-4773.
- LANGE, A., BEIER, S., STEIMLE, A., AUTENRIETH, I. B., HUSON, D. H. & FRICK, J. S. 2016. Extensive Mobilome-Driven Genome Diversification

- in Mouse Gut-Associated *Bacteroides vulgatus* mpk. *Genome Biol Evol*, 8, 1197-207.
- LAUDER, S. N., JONES, E., SMART, K., BLOOM, A., WILLIAMS, A. S., HINDLEY, J. P., ONDONDO, B., TAYLOR, P. R., CLEMENT, M., FIELDING, C., GODKIN, A. J., JONES, S. A. & GALLIMORE, A. M. 2013. Interleukin-6 limits influenza-induced inflammation and protects against fatal lung pathology. *Eur J Immunol*, 43, 2613-25.
- LEMOINE, S., MORVA, A., YOUINOU, P. & JAMIN, C. 2009. Regulatory B cells in autoimmune diseases: how do they work? *Ann N Y Acad Sci*, 1173, 260-7.
- LIU, Y. & RHOADS, J. M. 2013. Communication between B-cells and microbiota for the maintenance of intestinal homeostasis. *Antibodies*, 2, 535-553.
- LUGER, D., SILVER, P. B., TANG, J., CUA, D., CHEN, Z., IWAKURA, Y., BOWMAN, E. P., SGAMBELLONE, N. M., CHAN, C. C. & CASPI, R. R. 2008. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J Exp Med*, 205, 799-810.
- LUI, J. B., DEVARAJAN, P., TEPLICKI, S. A. & CHEN, Z. 2015. Cross-differentiation from the CD8 lineage to CD4 T cells in the gut-associated microenvironment with a nonessential role of microbiota. *Cell reports*, 10, 574-585.
- LUNDY, S. K. & BOROS, D. L. 2002. Fas ligand-expressing B-1a lymphocytes mediate CD4+-T-cell apoptosis during schistosomal infection: induction by interleukin 4 (IL-4) and IL-10. *Infection and immunity*, 70, 812-819.
- LUU, V. P., VAZQUEZ, M. I. & ZLOTNIK, A. 2014. B cells participate in tolerance and autoimmunity through cytokine production. *Autoimmunity*, 47, 1-12.
- MA, J., USUI, Y., TAKEDA, K., HARADA, N., YAGITA, H., OKUMURA, K. & AKIBA, H. 2011. TIM-1 signaling in B cells regulates antibody production. *Biochem Biophys Res Commun*, 406, 223-8.
- MA, J. K., PLATT, M. Y., EASTHAM-ANDERSON, J., SHIN, J.-S. & MELLMAN, I. 2012. MHC class II distribution in dendritic cells and B cells is determined by ubiquitin chain length. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 8820-8827.
- MAERZ, J. K., STEIMLE, A., LANGE, A., BENDER, A., FEHRENBACHER, B. & FRICK, J. S. 2018. Outer membrane vesicles blebbing contributes to *B. vulgatus* mpk-mediated immune response silencing. *Gut Microbes*, 9, 1-12.
- MAERZ, J. K., TROSTEL, C., LANGE, A., PARUSEL, R., MICHAELIS, L., SCHÄFER, A., YAO, H., LÖW, H.-C. & FRICK, J.-S. 2020. Bacterial immunogenicity is critical for the induction of regulatory B cells in suppressing inflammatory immune responses. *Frontiers in Immunology*, 10, 3093. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>
- MAFFEIS, C., MARTINA, A., CORRADI, M., QUARELLA, S., NORI, N., TORRIANI, S., PLEBANI, M., CONTREAS, G. & FELIS, G. E. 2016. Association between intestinal permeability and faecal microbiota

- composition in Italian children with beta cell autoimmunity at risk for type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 32, 700-709.
- MARIAT, D., FIRMESSE, O., LEVENEZ, F., GUIMARAES, V., SOKOL, H., DORE, J., CORTIER, G. & FURET, J. P. 2009. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*, 9, 123.
- MATSUKI, Y., OHMURA-HOSHINO, M., GOTO, E., AOKI, M., MITO-YOSHIDA, M., UEMATSU, M., HASEGAWA, T., KOSEKI, H., OHARA, O. & NAKAYAMA, M. 2007. Novel regulation of MHC class II function in B cells. *The EMBO journal*, 26, 846-854.
- MATSUSHITA, T., YANABA, K., BOUAZIZ, J.-D., FUJIMOTO, M. & TEDDER, T. F. 2008. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *The Journal of clinical investigation*, 118, 3420-3430.
- MAURI, C., GRAY, D., MUSHTAQ, N. & LONDEI, M. 2003. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *Journal of Experimental Medicine*, 197, 489-501.
- MAZMANIAN, S. K., LIU, C. H., TZIANABOS, A. O. & KASPER, D. L. 2005. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122, 107-18.
- MAZMANIAN, S. K., ROUND, J. L. & KASPER, D. L. 2008. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*, 453, 620-5.
- MCINTIRE, J. J., UMETSU, S. E., AKBARI, O., POTTER, M., KUCHROO, V. K., BARSH, G. S., FREEMAN, G. J., UMETSU, D. T. & DEKRUYFF, R. H. 2001. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol*, 2, 1109-16.
- MEDZHITOV, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 1, 135-45.
- MELLMAN, I. 2013. Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol Res*, 1, 145-9.
- MENGES, M., ROSSNER, S., VOIGTLANDER, C., SCHINDLER, H., KUKUTSCH, N. A., BOGDAN, C., ERB, K., SCHULER, G. & LUTZ, M. B. 2002. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med*, 195, 15-21.
- MEYERS, J. H., CHAKRAVARTI, S., SCHLESINGER, D., ILLES, Z., WALDNER, H., UMETSU, S. E., KENNY, J., ZHENG, X. X., UMETSU, D. T. & DEKRUYFF, R. H. 2005. TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nature immunology*, 6, 455.
- MINAGAWA, R., OKANO, S., TOMITA, Y., KISHIHARA, K., YAMADA, H., NOMOTO, K., SHIMADA, M., MAEHARA, Y., SUGIMACHI, K., YOSHIKAI, Y. & NOMOTO, K. 2004. The critical role of Fas-Fas ligand interaction in donor-specific transfusion-induced tolerance to H-Y antigen. *Transplantation*, 78, 799-806.
- MIURA, Y., THOBURN, C. J., BRIGHT, E. C., PHELPS, M. L., SHIN, T., MATSUI, E. C., MATSUI, W. H., ARAI, S., FUCHS, E. J. &

- VOGELSANG, G. B. 2004. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood*, 104, 2187-2193.
- MONTELEONE, I., PALLONE, F. & MONTELEONE, G. 2009. Interleukin-23 and Th17 cells in the control of gut inflammation. *Mediators of inflammation*, 2009.
- MOREAU, A., BLAIR, P. A., CHAI, J. G., RATNASOTHY, K., STOLARCZYK, E., ALHABBAB, R., RACKHAM, C. L., JONES, P. M., SMYTH, L. & ELGUETA, R. 2015. Transitional-2 B cells acquire regulatory function during tolerance induction and contribute to allograft survival. *European journal of immunology*, 45, 843-853.
- MORESCO, E. M. Y., LAVINE, D. & BEUTLER, B. 2011. Toll-like receptors. *Current Biology*, 21, R488-R493.
- MOSS, R. B., MOLL, T., EL-KALAY, M., KOHNE, C., SOO HOO, W., ENCINAS, J. & CARLO, D. J. 2004. Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications. *Expert Opin Biol Ther*, 4, 1887-96.
- NG, S. C., SHI, H. Y., HAMIDI, N., UNDERWOOD, F. E., TANG, W., BENCHIMOL, E. I., PANACCIONE, R., GHOSH, S., WU, J. C. & CHAN, F. K. 2017. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390, 2769-2778.
- NOZAKI, Y., KITCHING, A. R., AKIBA, H., YAGITA, H., KINOSHITA, K., FUNAUCHI, M. & MATSUMURA, I. 2014. Endogenous Tim-1 promotes severe systemic autoimmunity and renal disease MRL-Fas(lpr) mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 306, F1210-21.
- NUTMAN, T. B. 2015. Looking beyond the induction of Th2 responses to explain immunomodulation by helminths. *Parasite Immunol*, 37, 304-13.
- OLKHANUD, P. B., DAMDINSUREN, B., BODOGAI, M., GRESS, R. E., SEN, R., WEJKSZA, K., MALCHINKHUU, E., WERSTO, R. P. & BIRAGYN, A. 2011. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4+ T cells to T-regulatory cells. *Cancer research*.
- OPAZO, M. C., ORTEGA-ROCHA, E. M., CORONADO-ARRAZOLA, I., BONIFAZ, L. C., BOUDIN, H., NEUNLIST, M., BUENO, S. M., KALERGIS, A. M. & RIEDEL, C. A. 2018. Intestinal Microbiota Influences Non-intestinal Related Autoimmune Diseases. *Front Microbiol*, 9, 432.
- PENNATI, A., NG, S., WU, Y., MURPHY, J. R., DENG, J., RANGARAJU, S., ASRESS, S., BLANCHFIELD, J. L., EVAVOLD, B. & GALIPEAU, J. 2016. Regulatory B Cells Induce Formation of IL-10-Expressing T Cells in Mice with Autoimmune Neuroinflammation. *J Neurosci*, 36, 12598-12610.
- PETERSON, C., SHARMA, V., ELMÉN, L. & PETERSON, S. 2015. Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota. *Clinical & Experimental Immunology*, 179, 363-377.
- PICKARD, J. M., ZENG, M. Y., CARUSO, R. & NÚÑEZ, G. 2017. Gut microbiota: role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunological reviews*, 279, 70-89.

- RAFEI, M., CAMPEAU, P. M., AGUILAR-MAHECHA, A., BUCHANAN, M., WILLIAMS, P., BIRMAN, E., YUAN, S., YOUNG, Y. K., BOIVIN, M.-N. & FORNER, K. 2009. Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. *The Journal of Immunology*, 182, 5994-6002.
- RAKOFF-NAHOUM, S., PAGLINO, J., ESLAMI-VARZANEH, F., EDBERG, S. & MEDZHITOV, R. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118, 229-241.
- RAY, A., BASU, S., WILLIAMS, C. B., SALZMAN, N. H. & DITTEL, B. N. 2012. A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. *J Immunol*, 188, 3188-98.
- RAY, A., WANG, L. & DITTEL, B. N. 2015. IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action. *Int Immunol*, 27, 531-6.
- REHLI, M. 2002. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol*, 23, 375-8.
- RESCIGNO, M., URBANO, M., VALZASINA, B., FRANCOLINI, M., ROTTA, G., BONASIO, R., GRANUCCI, F., KRAEHENBUHL, J. P. & RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*, 2, 361-7.
- RICHARDS, J. L., YAP, Y. A., MCLEOD, K. H., MACKAY, C. R. & MARIÑO, E. 2016. Dietary metabolites and the gut microbiota: an alternative approach to control inflammatory and autoimmune diseases. *Clinical & translational immunology*, 5, e82.
- RIZZUTI, D., ANG, M., SOKOLLIK, C., WU, T., ABDULLAH, M., GREENFIELD, L., FATTOUH, R., REARDON, C., TANG, M., DIAO, J., SCHINDLER, C., CATTRAL, M. & JONES, N. L. 2015. Helicobacter pylori inhibits dendritic cell maturation via interleukin-10-mediated activation of the signal transducer and activator of transcription 3 pathway. *J Innate Immun*, 7, 199-211.
- ROOK, G., BÄCKHED, F., LEVIN, B. R., MCFALL-NGAI, M. J. & MCLEAN, A. R. 2017. Evolution, human-microbe interactions, and life history plasticity. *The Lancet*, 390, 521-530.
- ROSSER, E. C. & MAURI, C. 2015. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*, 42, 607-612.
- ROSSER, E. C., OLEINIKA, K., TONON, S., DOYLE, R., BOSMA, A., CARTER, N. A., HARRIS, K. A., JONES, S. A., KLEIN, N. & MAURI, C. 2014. Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1beta and interleukin-6 production. *Nat Med*, 20, 1334-9.
- ROUND, J. L. & MAZMANIAN, S. K. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*, 9, 313-23.
- ROUND, J. L. & MAZMANIAN, S. K. 2010. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 12204-9.

- SALLUSTO, F., LENIG, D., FÖRSTER, R., LIPP, M. & LANZAVECCHIA, A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401, 708.
- SCHELLER, J., CHALARIS, A., SCHMIDT-ARRAS, D. & ROSE-JOHN, S. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 878-88.
- SCHER, J. U., UBEDA, C., ARTACHO, A., ATTUR, M., ISAAC, S., REDDY, S. M., MARMON, S., NEIMANN, A., BRUSCA, S., PATEL, T., MANASSON, J., PAMER, E. G., LITTMAN, D. R. & ABRAMSON, S. B. 2015. Decreased bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Arthritis Rheumatol*, 67, 128-39.
- SCHLOISSNIG, S., ARUMUGAM, M., SUNAGAWA, S., MITREVA, M., TAP, J., ZHU, A., WALLER, A., MENDE, D. R., KULTIMA, J. R. & MARTIN, J. 2013. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature*, 493, 45.
- SCHWEIGHOFFER, E., NYS, J., VANES, L., SMITHERS, N. & TYBULEWICZ, V. L. J. 2017. TLR4 signals in B lymphocytes are transduced via the B cell antigen receptor and SYK. *J Exp Med*, 214, 1269-1280.
- SENDER, R., FUCHS, S. & MILO, R. 2016. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*, 164, 337-340.
- SHEN, P., ROCH, T., LAMPROPOULOU, V., O'CONNOR, R. A., STERVBO, U., HILGENBERG, E., RIES, S., DANG, V. D., JAIMES, Y., DARIDON, C., LI, R., JOUNEAU, L., BOUDINOT, P., WILANTRI, S., SAKWA, I., MIYAZAKI, Y., LEECH, M. D., MCPHERSON, R. C., WIRTZ, S., NEURATH, M., HOEHLIG, K., MEINL, E., GRUTZKAU, A., GRUN, J. R., HORN, K., KUHL, A. A., DORNER, T., BAR-OR, A., KAUFMANN, S. H. E., ANDERTON, S. M. & FILLATREAU, S. 2014. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*, 507, 366-370.
- SHI, N., LI, N., DUAN, X. & NIU, H. 2017. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Military Medical Research*, 4, 14.
- STEIMLE, A., MICHAELIS, L., DI LORENZO, F., KLIEM, T., MÜNZNER, T., MAERZ, J. K., SCHÄFER, A., LANGE, A., PARUSEL, R. & GRONBACH, K. 2019. Weak agonistic LPS restores intestinal immune homeostasis. *Molecular Therapy*.
- STEINBRINK, K., WÖLFL, M., JONULEIT, H., KNOP, J. & ENK, A. H. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 159, 4772-4780.
- STEINMAN, R. M. & COHN, Z. A. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, 137, 1142-62.
- SUN, J.-B., FLACH, C.-F., CZERKINSKY, C. & HOLMGREN, J. 2008. B lymphocytes promote expansion of regulatory T cells in oral tolerance: powerful induction by antigen coupled to cholera toxin B subunit. *The Journal of Immunology*, 181, 8278-8287.

- TAKEUCHI, O., HOSHINO, K., KAWAI, T., SANJO, H., TAKADA, H., OGAWA, T., TAKEDA, K. & AKIRA, S. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11, 443-51.
- TALAAT, R. M., MOHAMED, S. F., BASSYOUNI, I. H. & RAOUF, A. A. 2015. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine*, 72, 146-53.
- TESMER, L. A., LUNDY, S. K., SARKAR, S. & FOX, D. A. 2008. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev*, 223, 87-113.
- THE HUMAN MICROBIOME PROJECT, C., HUTTENHOWER, C., GEVERS, D., KNIGHT, R., ABUBUCKER, S., BADGER, J. H., CHINWALLA, A. T., CREASY, H. H., EARL, A. M., FITZGERALD, M. G., FULTON, R. S., GIGLIO, M. G., HALLSWORTH-PEPIN, K., LOBOS, E. A., MADUPU, R., MAGRINI, V., MARTIN, J. C., MITREVA, M., MUZNY, D. M., SODERGREN, E. J., VERSALOVIC, J., WOLLAM, A. M., WORLEY, K. C., WORTMAN, J. R., YOUNG, S. K., ZENG, Q., AAGAARD, K. M., ABOLUDE, O. O., ALLEN-VERCOE, E., ALM, E. J., ALVARADO, L., ANDERSEN, G. L., ANDERSON, S., APPELBAUM, E., ARACHCHI, H. M., ARMITAGE, G., ARZE, C. A., AYVAZ, T., BAKER, C. C., BEGG, L., BELACHEW, T., BHONAGIRI, V., BIHAN, M., BLASER, M. J., BLOOM, T., BONAZZI, V., PAUL BROOKS, J., BUCK, G. A., BUHAY, C. J., BUSAM, D. A., CAMPBELL, J. L., CANON, S. R., CANTAREL, B. L., CHAIN, P. S. G., CHEN, I. M. A., CHEN, L., CHHIBBA, S., CHU, K., CIULLA, D. M., CLEMENTE, J. C., CLIFTON, S. W., CONLAN, S., CRABTREE, J., CUTTING, M. A., DAVIDOVICS, N. J., DAVIS, C. C., DESANTIS, T. Z., DEAL, C., DELEHAUNTY, K. D., DEWHIRST, F. E., DEYCH, E., DING, Y., DOOLING, D. J., DUGAN, S. P., MICHAEL DUNNE, W., SCOTT DURKIN, A., EDGAR, R. C., ERLICH, R. L., FARMER, C. N., FARRELL, R. M., FAUST, K., FELDGARDEN, M., FELIX, V. M., FISHER, S., FODOR, A. A., FORNEY, L. J., FOSTER, L., DI FRANCESCO, V., FRIEDMAN, J., FRIEDRICH, D. C., FRONICK, C. C., FULTON, L. L., GAO, H., GARCIA, N., GIANNOUKOS, G., GIBLIN, C., GIOVANNI, M. Y., GOLDBERG, J. M., GOLL, J., GONZALEZ, A., et al. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486, 207.
- TIAN, J., ZEKZER, D., HANSEN, L., LU, Y., OLCOTT, A. & KAUFMAN, D. L. 2001. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 167, 1081-9.
- TURNBAUGH, P. J., HAMADY, M., YATSUNENKO, T., CANTAREL, B. L., DUNCAN, A., LEY, R. E., SOGIN, M. L., JONES, W. J., ROE, B. A., AFFOURTIT, J. P., EGHOLM, M., HENRISSAT, B., HEATH, A. C., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457, 480-4.
- TURNBAUGH, P. J., LEY, R. E., HAMADY, M., FRASER-LIGGETT, C. M., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. 2007. The Human Microbiome Project. *Nature*, 449, 804.

- UMETSU, S. E., LEE, W. L., MCINTIRE, J. J., DOWNEY, L., SANJANWALA, B., AKBARI, O., BERRY, G. J., NAGUMO, H., FREEMAN, G. J., UMETSU, D. T. & DEKRUYFF, R. H. 2005. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat Immunol*, 6, 447-54.
- VAN DE VEEN, W., STANIC, B., WIRZ, O. F., JANSEN, K., GLOBINSKA, A. & AKDIS, M. 2016. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138, 654-665.
- VAN OLFFEN, R. W., KONING, N., VAN GISBERGEN, K. P., WENSVEEN, F. M., HOEK, R. M., BOON, L., HAMANN, J., VAN LIER, R. A. & NOLTE, M. A. 2009. GITR triggering induces expansion of both effector and regulatory CD4+ T cells in vivo. *The Journal of Immunology*, 182, 7490-7500.
- VERMA, R., BALAKRISHNAN, L., SHARMA, K., KHAN, A. A., ADVANI, J., GOWDA, H., TRIPATHY, S. P., SUAR, M., PANDEY, A., GANDOTRA, S., PRASAD, T. S. & SHANKAR, S. 2016. A network map of Interleukin-10 signaling pathway. *J Cell Commun Signal*, 10, 61-7.
- WAIDMANN, M., BECHTOLD, O., FRICK, J. S., LEHR, H. A., SCHUBERT, S., DOBRINDT, U., LOEFFLER, J., BOHN, E. & AUTENRIETH, I. B. 2003. *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology*, 125, 162-77.
- WANG, H.-C., ZHOU, Q., DRAGOO, J. & KLEIN, J. R. 2002. Most murine CD8+ intestinal intraepithelial lymphocytes are partially but not fully activated T cells. *The Journal of Immunology*, 169, 4717-4722.
- WANG, L., ROTHEMUND, D., CURD, H. & REEVES, P. R. 2003. Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. *Journal of bacteriology*, 185, 2936-2943.
- WOLF, S. D., DITTEL, B. N., HARDARDOTTIR, F. & JANEWAY, C. A. 1996. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*, 184, 2271-2278.
- WU, G. D., CHEN, J., HOFFMANN, C., BITTINGER, K., CHEN, Y. Y., KEILBAUGH, S. A., BEWTRA, M., KNIGHTS, D., WALTERS, W. A., KNIGHT, R., SINHA, R., GILROY, E., GUPTA, K., BALDASSANO, R., NESSEL, L., LI, H., BUSHMAN, F. D. & LEWIS, J. D. 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334, 105-8.
- YANABA, K., BOUAZIZ, J.-D., MATSUSHITA, T., TSUBATA, T. & TEDDER, T. F. 2009. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *The Journal of Immunology*, 182, 7459-7472.
- YANABA, K., BOUAZIZ, J. D., HAAS, K. M., POE, J. C., FUJIMOTO, M. & TEDDER, T. F. 2008. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*, 28, 639-50.
- YOSHIZAKI, A., MIYAGAKI, T., DILILLO, D. J., MATSUSHITA, T., HORIKAWA, M., KOUNTIKOV, E. I., SPOLSKI, R., POE, J. C., LEONARD, W. J. & TEDDER, T. F. 2012. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature*, 491, 264.

- ZHANG, H., LIAO, X., SPARKS, J. B. & LUO, X. M. 2014. Dynamics of gut microbiota in autoimmune lupus. *Appl Environ Microbiol*, 80, 7551-60.
- ZHANG, Y., GALLASTEGUI, N. & ROSENBLATT, J. D. 2015. Regulatory B cells in anti-tumor immunity. *International immunology*, 27, 521-530.
- ZHAO, G., MOORE, D. J., LEE, K. M., KIM, J. I., DUFF, P. E., O'CONNOR, M. R., HIROHASHI, T., LEI, J., YANG, M. & MARKMANN, J. 2010. An unexpected counter-regulatory role of IL-10 in B-lymphocyte-mediated transplantation tolerance. *American Journal of Transplantation*, 10, 796-801.
- ZIĘTARA, N., ŁYSZKIEWICZ, M., KRUEGER, A. & WEISS, S. 2014. B-cell modulation of dendritic-cell function: Signals from the far side. *European journal of immunology*, 44, 23-32.

## 6 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Interfakultären Institut für Mikrobiologie und Hygiene Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Julia-Stefanie Frick durchgeführt.

Die Konzeption der Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit Jan Maerz, Master of Science und Prof. Dr. Julia-Stefanie Frick. Dabei beruht das Konzept auf Vorarbeiten von Jan Maerz.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Jan Maerz, Annika Bender und Andrea Schäfer von mir teils eigenständig und teils mit Unterstützung durch Jan Maerz durchgeführt. Die Durchführung der Zellkulturen und Immunfärbungen der B-Zell-Charakterisierung, des T-Zell-Proliferationsassays und der weiteren Co-Kulturen erfolgte durch mich mit zeitweiser Unterstützung durch Jan Maerz. Die Durchflusszytometrie habe ich nach Hilfe bei der Geräteeinstellung selbstständig durchgeführt.

Zellkultur, Immunfärbung und Messung der erweiterten B-Zell-Charakterisierung mit regulatorischen Oberflächenmarkern erfolgte eigenständig durch mich.

Die Versuche zur Fluoreszenzmikroskopie wurden nach Planungsunterstützung durch Andrea Schäfer selbstständig von mir durchgeführt. Bei der Bedienung des Fluoreszenzmikroskops erhielt ich Beratung von Jessica Schade.

Die statistische Auswertung erfolgte, nach Einarbeitung in die Programme durch Jan Maerz, eigenständig durch mich.

Alle Abbildungen, inklusive der Abbildung 19, die auch in veränderter Form von uns bereits publiziert wurde, wurden eigenständig von mir konzipiert und erstellt. Dabei erfolgte regelmäßige Rücksprache mit Jan Maerz.

Der Entwurf der Abbildung 11 F stammt von Jan Maerz und wurde von mir modifiziert und selbst nochmals erstellt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Constanze Trostel

## 7 Veröffentlichungen

MAERZ, J. K., TROSTEL, C., LANGE, A., PARUSEL, R., MICHAELIS, L., SCHAEFER, A. ... & FRICK, J. S. (2020). Bacterial immunogenicity is critical for the induction of regulatory B cells in suppressing inflammatory immune responses. *Frontiers in immunology*, 10, 3093.

[Creative Commons Attribution License — CC BY 4.0:](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

## **8 Danksagung**

Ich danke an erster Stelle der AG Frick mit ihren vielen großartigen Teammitgliedern (Andi, Annika, Lena, Anna, Vanessa, Alex, Thomas und Raphael), die mich zu jedem Zeitpunkt bei Fragen und Problemen mit großer Bereitschaft unterstützt haben. Besonders danke ich Jan, der mich im Labor eingelernt hat und mich bei der Planung und Durchführung der Experimente, sowie beim Verfassen der Doktorarbeit mit viel Einsatz betreut hat.

Ein großes Dankeschön auch an Julia, die diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat und als Gruppenleiterin die Grundvoraussetzung für diese interessante Forschung bot.

Schließlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung, Motivation und jederzeit guten Ratschläge vor, während und nach dieser Zeit.