Aus dem

Department für Diagnostische Labormedizin der Universität Tübingen

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Der Einfluss kommensaler Darmbakterien auf die Induktion und Entstehung TH17-vermittelter Autoimmunerkrankungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Fellmeth, Hanna Christine
2025

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professorin Dr. J. S. Frick
2. Berichterstatter:	Professorin Dr. B. Schittek
Tag der Disputation:	10.01.2025

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Mikrobiom 1

1.2 Immunsystem 2

1.2.1 Angeborenes Immunsystem 2

1.2.2 Erworbenes Immunsystem 3

1.3 Dendritische Zellen 4

1.4 T-Zellen 5

1.4.1 T-Helferzellen 5

1.4.2 Regulatorische T-Zellen 7

1.5 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen 8

1.6 MCPIP1 und IκBζ 10

1.7 Pathobiont vs. Symbiont 11

1.8 Vorarbeiten zum Thema 12

1.9 Hypothese 13

1.10 Ziele der Doktorarbeit 15

2 Material und Methoden 16

2.1 Material 16

2.1.1 Geräte 16

2.1.2 Verbrauchsmaterialien 17

2.1.3 Medien und Puffer 17

2.1.4 Lösungen, Chemikalien und Agar 19

2.1.5 Antibiotika 20

2.1.6 Kits 20

2.1.7 Antikörper 20

2.1.8 Primer 22

2.1.9 Bakterien 22

2.1.10 Mäuse 22

2.2 Methoden 23

2.2.1 Zellisolation und Zellkultur 23

2.2.2 Kultivierung und Quantifizierung von Bakterien 25

2.2.3 Stimulation 26
2.2.4 In vivo-Modelle 30
2.2.5 Fixierung und intra-/extrazelluläre Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie (FACS) 34
2.2.6 RNA-Isolation und DNase-Verdau 35
2.2.7 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) 36
2.2.8 FACS-Auswertung 38
2.2.9 Statistik 38
3 Ergebnisse 39
3.1 Analyse des Proteinlevels von MCPIP1 und IκBζ nach *in vitro* Stimulation von WT-BMDCs mit *B. vulgatus* und *E. coli* 39
3.2 Analyse der T-Zellpolarisation und des Proteinlevels von MCPIP1 und IκBζ in dendritischen Zellen nach Monokolonisierung gnotobiotischer WT-Mäuse mit *B. vulgatus* und *E. coli* 42
3.3 Analyse der T-Zellpolarisation und des Proteinlevels von MCPIP1 und IκBζ nach Monokolonisierung mit *B. vulgatus* und *E. coli* und T-Zelltransfer auf gnotobiotische Rag1$^{-/-}$ Mäuse 51
3.4 Analyse der T-Zellpolarisation und -proliferation nach *in vitro* Stimulation einer Cokultur von WT-BMDCs und OT-II-T-Zellen mit *B. vulgatus* und *E. coli* 58
3.5 *E. coli*-Stimulation führt zu einem positiven Feedbackloop von IκBζ-Expression in dendritischen Zellen 64
4 Diskussion 67
4.1 IκBζ wird *in vitro* im Zeitverlauf durch kommensale Darmbakterien reguliert 67
4.2 In gesunden keimfreien Mäusen führt eine Monokolonisierung mit Pathobiont bzw. Symbiont zu keinen Unterschieden der T-Zellpolarisation sowie des Proteinlevels von MCPIP1 und IκBζ 70
4.3 In keimfreien Rag1$^{-/-}$ Mäusen führt eine Monokolonisierung mit *B. vulgatus* bzw. *E. coli* nach T-Zelltransfer zu keinen relevanten Unterschieden der T-Zellpolarisation sowie des Proteinlevels von MCPIP1 und IκBζ 74
4.4 T-Zellpolarisation und -proliferation nach *in vitro* Stimulation einer Cokultur von WT-BMDCs und OT-II-T-Zellen mit *B. vulgatus* und *E. coli* sowie Feedbackloop zwischen dendritischen und T-Zellen 75

4.5 *E. coli*-Stimulation führt zu einem Feedbackloop von IκBζ-Expression in dendritischen Zellen _____ 77

5 Zusammenfassung _____ 79

6 Literaturverzeichnis _____ 81

7 Erklärung zum Eigenanteil _____ 88

8 Veröffentlichungen _____ 89

9 Danksagung _____ 90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis 5
Tabelle 2 Übersicht über die Subtypen der T-Zellen, modifiziert nach (McComb et al., 2019) 5
Tabelle 3: Geräte 16
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien 17
Tabelle 5: Medien 17
Tabelle 6: Puffer 18
Tabelle 7: Lösungen und Chemikalien 19
Tabelle 8: Agar 20
Tabelle 9: Antibiotika 20
Tabelle 10: Kits 20
Tabelle 11: Antikörper 20
Tabelle 12: Primer 22
Tabelle 13: Bakterien 22
Tabelle 14: Mäuse 22
Tabelle 15: Kombinationsschema Co-Kultur 27
Tabelle 16: Versuchsgruppen in vivo-Versuch 1 30
Tabelle 17: Versuchsgruppen in vivo-Versuch 2 32

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
B. vulgatus	*Bacteroides vulgatus*
BHI	*Brain Heart Infusion*
BMDC	Knochenmarksgereifte dendritische Zelle (*Bone-marrow derived dendritic cell)*
CD	*Cluster of differentiation*
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CFU	Koloniebildende Einheit *(colony forming unit)*
CNA	*Colistin Nalidixic Agar*
CTLA-4	*Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*
DC	Dendritische Zelle *(dendritic cell)*
DNA	Desoxyribonukleinsäure *(desoxyribonucleic acid)*
DNase	Desoxyribonuklease
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELP	Erythrozyten-Lysepuffer
EtOH	Ethanol
FACS	*Fluorescence activated cell sorting*
Fc-Block	*Fragment crystallisable Block*
FBS	Fetales Kälberserum
FMO	Fluorescence minus one
FoxP3	*Forkhead-Box-Protein P3*

FSC	*Forward scatter*
FVD	*Fixable Viability Dye*
g	Gramm
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
GATA-3	*GATA-binding protein 3*
GM-CSF	*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*
h	Stunde
HBSS	*Hank´s Balanced Salt Solution*
HEPES	Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure
IFNγ	Interferon γ
IL	Interleukin
KV	Kanamycin-Vancomycin
L	Liter
LB-Medium	*Lysogeny broth medium*
LPS	Lipopolysaccharid
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
MAMP	*microbe-associated molecular patterns*
min	Minute
mL	Milliliter
mLN	Mesenteriale Lymphknoten (*mesenteric lymph node*)
MCPIP-1	*Monocyte chemotactic protein-induced protein 1*
MHC	*Major histocompatibility complex*
MOI	*Multiplicity of Infection*
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PFA	Paraformaldehyd
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RLT	RNA-Lysepuffer
RNA	Ribonukleinsäure *(ribonucleic acid)*
RORγt	*Retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma*
rpm	Rotationsgeschwindigkeit (Umdrehungen pro Minute)
RPMI-Medium	*Roswell Park Memorial Institute Medium*
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SPF	Spezifisch pathogenfrei
SSC	*Side scatter*
Tab.	Tabelle
T-bet	*T-box expressed in T-cells*
TCR	T-Zellrezeptor *(T cell receptor)*
T_H	T-Helferzelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Mikrobiom

Das Mikrobiom des Darms und dessen Einfluss auf die Entstehung bestimmter Erkrankungen hat in den letzten Jahren zunehmend an Interesse gewonnen. Mit einer Oberfläche, die 200-mal größer ist als die unserer Haut, und zwischen 10^{14} bis 10^{15} Bakterien beherbergt, die meisten davon im Kolon, zählt der Gastrointestinaltrakt als das größte immunologische Organ des menschlichen Körpers (Rutella and Locatelli, 2011, Sender et al., 2016). Das Mikrobiom des Darms entsteht während des Geburtsvorgangs und wird neben genetischen Faktoren im Laufe des Lebens von der Umwelt, Ernährung, Infektionen mit Pathogenen und der Einnahme von Medikamenten wie beispielsweise Antibiotika geprägt (Zimmer et al., 2012, Ubeda and Pamer, 2012, Jackson et al., 2016, Dominguez-Bello et al., 2010). Die Mikrobiota des adulten Menschen setzt sich aus Bakterien, Eukaryoten und Archaeen zusammen, wobei 75% der Mikrobiota aus Bakterien besteht (Donaldson et al., 2016). Diese unterteilen sich wiederum in etwa 40 verschiedene Bakterienspezies. Der Großteil der Bakterien im adulten Individuum besteht aus *Firmicutes* und *Bacteroides* (Eckburg et al., 2005). Jedoch unterscheidet sich das Mikrobiom zwischen einzelnen Individuen teils stark. Der Aufbau der intestinalen Mikrobiota könnte für die Entstehung gewisser Erkrankungen prädestinieren.

Die Zusammensetzung der Mikrobiota unterscheidet sich auch zwischen Dünn- und Dickdarm. Im Dünndarm überwiegen im Vergleich zum Dickdarm aufgrund des sauren pH, der kürzeren Passierzeit der Nahrungsbestandteile und des vorhandenen Sauerstoffs fakultative Aerobier wie Enterobakterien und Laktobazillen. Im Dickdarm hingegen finden sich vermehrt Anaerobier wie Clostridien und *Bacteroidaceae* (Donaldson et al., 2016).

Im gesunden Darm besteht eine antimikrobielle Barriere des Darmepithels, welche verhindert, dass Bakterien und Pathogene die Darmmukosa überwinden können. Dies ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Homöostase (Wehkamp and Frick, 2017).

1.2 Immunsystem

1.2.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist in der Lage, sehr schnell auf Antigene reagieren zu können. Bei Antigenen handelt es sich um molekulare Strukturen, welche vom Immunsystem erkannt werden und daher eine Immunreaktion zur Eliminierung des Antigens auslösen können. Antigene müssen nicht zwangsläufig eine Immunreaktion auslösen. Sie können sich auch auf Körperzellen oder symbiotischen Bakterien befinden. Zum angeborenen Immunsystem zählen zum einen mechanische Barrieren wie die Haut, Schleimhaut, das Flimmerepithel der Atemwege sowie der Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt, aber auch verschiedene Immunzellen (zelluläre Immunabwehr) und Zytokine (humorale Immunabwehr). Sogenannte MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*) binden an z.B. Toll-like-Rezeptoren (TLR) und werden so von verschiedenen Immunzellen erkannt. Makrophagen betreiben daraufhin eine Phagozytose des Antigens und lösen eine Inflammation aus. Mastzellen schütten Histamin und Heparin aus und sorgen auf diese Weise für eine Immunreaktion. Natürliche Killerzellen erkennen und eliminieren Viruspartikel und Tumorzellen. Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile und Basophile) erkennen Parasiten, Tumorzellen und Bakterien und lösen eine akute Inflammation des Gewebes aus, indem sie u.a. Blutgefäße dilatieren, sodass weitere Immunzellen schneller an den Ort der Inflammation kommen können. Dendritische Zellen als Form der Antigen-präsentierenden Zellen phagozytieren und internalisieren das Antigen und können Fragmente dessen auf ihrer Zelloberfläche anderen Immunzellen präsentieren. Dadurch bilden sie die Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Zur humoralen Immunabwehr zählen das Komplementsystem und verschiedene Zytokine. Die Faktoren des Komplementsystems binden an Pathogene und zerstören diese durch Proteolyse. (McComb et al., 2019, Hillion et al., 2020, Yatim and Lakkis, 2015, Tomar and De, 2014)

1.2.2 Erworbenes Immunsystem

Das adaptive Immunsystem reagiert im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem erst nach einigen Tagen und kann Gedächtniszellen ausbilden, welche im Fall eines erneuten Kontakts mit dem Antigen zu einer schnelleren und effektiveren Immunabwehr führen. Hierzu zählen zum einen auf zellulärer Seite B- und T-Lymphozyten und auf humoraler Seite Antikörper und Zytokine. Zytokine sind Botenstoffe, welche zur Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellen dienen. Interleukine aktivieren verschiedene Leukozyten, Chemokine locken andere Zellen an den Ort der Inflammation, der Tumornekrosefaktor (TNF) hemmt die Tumorentstehung und Interferone spielen eine Rolle bei der Bekämpfung von Virusinfektionen und Tumorzellen.

Wie oben bereits erwähnt, bilden dendritische Zellen die Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunabwehr. Eine wichtige Rolle spielen hierbei *Major Histocompatibility Complexes* (MHC). MHC I wird von allen kernhaltigen Immunzellen exprimiert und präsentieren $CD8^+$ Zellen Bestandteile intrazellulärer Pathogene. MHC II präsentieren $CD4^+$ Zellen Bestandteile extrazellulärer Pathogene und werden nur auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert, darunter B-Zellen und dendritische Zellen. Naive T- und B-Zellen zirkulieren durch das Blut über die hoch-endothelialen Venolen in die Lymphknoten. Treffen naive T-Zellen auf dendritische Zellen, so hängt es von der Affinität der Bindung zwischen T-Zelle und dendritischer Zelle ab, ob die T-Zelle aktiviert wird. Dendritische Zellen besitzen co-stimulierende Molekülstrukturen auf ihrer Zelloberfläche, sogenannte *Cluster of Differentiation,* z.B. CD40, CD80 oder CD86. Diese können die Affinität der Bindung zwischen T-Zelle und dendritischer Zelle verstärken, sodass die naive T-Zelle aktiviert wird. $CD8^+$ T-Zellen wandern nach ihrer Aktivierung in die Peripherie und suchen dort nach Liganden, welche über MHC I präsentiert werden. Durch Bindung an diese Zelle schütten $CD8^+$ T-Zellen lytische Granula aus, welche zum Zelltod der Zielzelle führen.

$CD4^+$ T-Zellen, auch T-Helferzellen genannt, haben verschiedene Funktionen. TH1-Zellen schütten IFN (Interferon) γ und IL-12 (Interleukin 12) aus und sorgen

auf diese Weise für eine Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen, sodass Viren und Bakterien eliminiert werden können. TH2-Zellen sezernieren IL-4 und initiieren damit eine Immunreaktion, welche durch B-Zellen vermittelt wird. Wird der B-Zellrezeptor durch Bindung eines Liganden aktiviert, nimmt die B-Zelle den B-Zellrezeptor sowie den Liganden auf und verdaut das Antigen. Daraufhin präsentiert die B-Zelle jenes auf MHC II, welches bei Zusammentreffen der B-Zelle mit einer $CD4^+$ T-Zelle zur Bindung zwischen beiden führt. Durch die Ausschüttung verschiedener Interleukine kommt es zur Aktivierung und Differenzierung der B-Zelle. Sie wird zur Plasmazelle und ist fortan in der Lage, Antikörper zu produzieren. (McComb et al., 2019, Yatim and Lakkis, 2015, Tomar and De, 2014)

1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind eine Form Antigen-präsentierender-Zellen, welche erste Immunantworten initiieren, modulieren und Antigene prozessieren können. Sie können T- und B-Lymphozyten effizient co-stimulieren und aktivieren. Im Elektronenmikroskop präsentieren sich dendritische Zellen mit > 10 μm langen, sternförmigen Fortsätzen. Als immature dendritische Zellen sind sie weniger potente Immuninitiatoren. Sie fangen Antigene ein, nehmen diese über Phagozytose auf, formen daraufhin über Pinozytose Vesikel und exprimieren Rezeptoren, welche die Endozytose vermitteln. Ein Antigenkontakt kann für immature dendritische Zellen ein Signal sein, matur zu werden. Die dendritischen Zellen migrieren nach dem Antigenkontakt zu den lymphatischen Organen (Milz und Lymphknoten), interagieren dort mit naiven T-Zellen und stimulieren diese. Antigenbestandteile werden dem T-Zellrezeptor über MHC-Komplexe auf der Oberfläche von dendritischen Zellen präsentiert. Zusätzlich exprimieren dendritische Zellen noch weitere Moleküle, die mit dem TCR interagieren können. Sind T-Lymphozyten einmal von dendritischen Zellen aktiviert, können sie die Immunantwort komplettieren, indem sie mit anderen Immunzellen wie B-Zellen und Makrophagen interagieren (Banchereau and Steinman, 1998).

Dendritische Zellen können auch eine Toleranz der T-Zellen gegenüber körpereigenen Antigenen hervorrufen, um Autoimmunreaktionen zu minimieren bzw. zu verhindern. (Banchereau and Steinman, 1998, Steimle and Frick, 2016)

1.4 T-Zellen

Tabelle 2 Übersicht über die Subtypen der T-Zellen, modifiziert nach (McComb et al., 2019)

$CD4^+$ T-Zelle	**Transkriptionsfaktor**	**Aktivierung durch**	**Zytokinproduktion**
TH1-Zelle	T-bet	IL-12, IFNγ	IFNγ
TH2-Zelle	GATA-3	IL-4	IL-4
TH17-Zelle	RORγt	IL-23, IL1β	IL-17
Th1 like TH17-Zelle	RORγt, T-bet	IL-12, IL-23, IFNγ	IL-17, IFNγ
Treg	FoxP3	IL-2, TGFβ	TGFβ, IL-10, IL-35, IL-17

1.4.1 T-Helferzellen

Wie bereits in 1.2.2 erwähnt, handelt es sich bei T-Helferzellen um $CD4^+$ T-Zellen, welche als Effektorzellen durch Produktion verschiedener Zytokine zum einen zur Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen und zum anderen zur Aktivierung der B-Zell-vermittelten Immunantwort beitragen. Die verschiedenen Untergruppen von T-Helferzellen werden anhand der ausgeschütteten Zytokine, der exprimierten Rezeptoren und der Transkriptionsfaktoren unterschieden. Relevant für die vorliegende Arbeit sind insbesondere TH1-, TH2- und TH17-Zellen, siehe Tabelle 2 und Abbildung 1.

TH1-Zellen produzieren IFNγ, können Fresszellen aktivieren und bieten Schutz vor intrazellulären Antigenen (Romagnani, 1994). Durch Binden der Zelle von IL-12 und IFNγ wird der Transkriptionsfaktor T-bet (*T-box expressed in T-cells*)

aktiviert, was zur Differenzierung der $CD4^+$ T-Zelle zu TH1-Zellen führt (Wu et al., 1993). Gleichzeitig kommt es durch die T-bet-Aktivierung in Form eines Feedbackmechanismus zu gesteigerter IFNγ-Produktion, was wiederum zu noch stärkerer T-bet-Aktivierung führt (Bradley et al., 1996). Auch natürliche Killerzellen produzieren IFNγ und sorgen somit für eine Differenzierung der naiven T-Zellen zu TH1-Zellen (Martin-Fontecha et al., 2004). TH1-Zellen scheinen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Arthritis, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und autoimmuner Enzephalomyelitis zu spielen (Kullberg et al., 2006). Allen drei Erkrankungen ist eine dysregulierte TH1-Antwort gemeinsam.

TH2-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei Schutz vor Helminthen und gleichzeitig bei der Entstehung allergischer Reaktionen wie dem allergischen Asthma (Pulendran and Artis, 2012, Cohn et al., 1997, Robinson et al., 1992). Zum einen führen dendritische Zellen über eine Aktivierung von T-Helferzellen zur Freisetzung von IL-4 und damit zur Aktivierung von GATA-3 (*GATA-binding protein 3*), dem Transkriptionsfaktor von TH2-Zellen. Zum anderen sorgen intestinale Mastzellen und Makrophagen bei wurminfizierten Individuen zur vermehrten Produktion von IL-4, was wiederum eine Differenzierung von $CD4^+$ T-Zellen in TH2-Zellen bewirkt (Owyang et al., 2006).

TH17-Zellen schützen den Organismus vor extrazellulären Bakterien und Pilzen über eine Stimulation neutrophiler Granulozyten. Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten kann zum einen indirekt über eine Freisetzung von IL-8 erfolgen, zum anderen direkt über die Expression von CXCL8 (*CXC Motif Chemokine Ligand 8*) (Pelletier et al., 2010). TH17-Zellen exprimieren RORγt (*Retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor* γ) als Transkriptionsfaktor und besitzen auf ihrer Oberfläche verschiedene Rezeptoren für IL-23, CCR6 (*C-C Motif Chemokine Receptor 6*) und CD161 (Ivanov et al., 2006, Annunziato et al., 2007, Acosta-Rodriguez et al., 2007, Cosmi et al., 2008). Um $CD4^+$ T-Zellen zur Differenzierung zu TH17-Zellen zu bewegen, sind IL-23 und IL-1β notwendig. An dieser Stelle besteht ein Zusammenhang zur Induktion von TH1-Zellen: In Gegenwart von IL-12 wirken IL-23 und IL-1β zusätzlich auch auf T-bet, den

Transkriptionsfaktor von TH1-Zellen. Somit ist IL-1β wichtig für T-Zellen, die sowohl IL-17 als auch IFNγ produzieren: TH1-like-TH17-Zellen (Zielinski et al., 2012). An dieser Stelle soll auch noch auf die Plastizität von TH17-Zellen hingewiesen werden. Differenzierte $CD4^+$ T-Zellen sind in der Lage, ihre Zytokinproduktion flexibel zu variieren.

Eine dysregulierte Aktivierung von TH17-Zellen spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese zahlreicher Autoimmunerkrankungen wie multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Kontaktdermatitis und Psoriasis (Yasuda et al., 2019, Stockinger and Omenetti, 2017).

1.4.2 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Tregs) zählen zu den $CD4^+$ T-Zellen und exprimieren FoxP3 (*Forkhead-Box-Protein P3*) als Transkriptionsfaktor (Rutella and Locatelli, 2011, Shevach et al., 2006). Sie entstehen entweder in der Peripherie, indem sie dort aktiviert werden, oder im Thymus. Tregs sind in der Lage, zu starke Immunantworten zu bremsen, anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10, IL-35, TGFβ (*Transforming Growth Factor beta*) zu produzieren und eine Homöostase gegenüber dem Mikrobiom herzustellen (Rutella and Locatelli, 2011, Lee, 2018). Sie spielen somit eine wichtige Rolle im Rahmen der Immuntoleranz gegenüber Antigenen und somit bei der Prävention von Autoimmunerkrankungen (Lee, 2018). IL-2 und TGFβ sorgen für eine Induktion der Differenzierung $CD4^+$ Zellen hin zu Tregs. TGFβ kann im Zusammenspiel mit IL-6 und IL-21 auch zur Differenzierung zu TH17-Zellen führen, jedoch für TGFβ allein oder in Kombination mit IL-2 zur Differenzierung zu Tregs (Rutella and Locatelli, 2011, Lee, 2018). Die intestinale Mikrobiota hat ebenso einen Einfluss auf die Differenzierung und Funktion von Tregs.

Des Weiteren gibt es IL17-produzierende Tregs (anti-Tregs). Sie sind wie die oben beschriebenen Tregs $CD4^+$ und haben FoxP3 als Transkriptionsfaktor, produzieren jedoch auch das pro-inflammatorische IL-17 wie TH17-Zellen. Sie vereinen damit Charakteristika von TH17-Zellen und Tregs. In (Hovhannisyan et al., 2011) wurde gezeigt, dass diese in Patienten mit Morbus Crohn vorkommen,

jedoch nicht in Patienten mit Colitis ulcerosa oder gesunden Individuen. Für die Entstehung dieser IL-17-produzierenden Tregs ist TGF-β notwendig. In entzündetem Gewebe können Tregs durch spezifische Entzündungsparameter, wie TGF-β, in zusätzlich IL-17 produzierende Zellen umgewandelt werden und damit proinflammatorisch wirken.

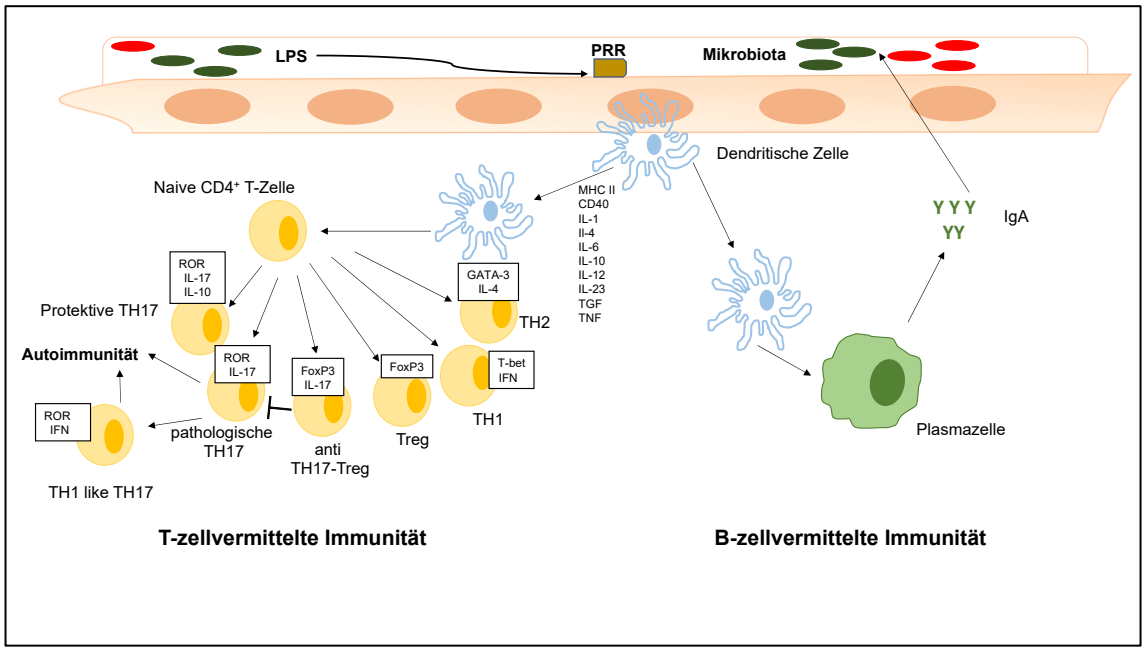

Abbildung 1 Überblick über die T- und B-zellvermittelte Immunität, adaptiert von (Kapitan et al., 2019)

1.5 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) umfassen die Krankheitsbilder der Colitis ulcerosa sowie des Morbus Crohn und nehmen an Inzidenz zu. Meist treten diese bei Patienten im Alter zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr auf. Morbus Crohn zeichnet sich durch eine diskontinuierliche, transmurale Infektion mit tiefen Ulzerationen, welche den kompletten Gastrointestinaltrakt betreffen kann, aus. In der Regel sind das terminale Ileum und die Perianalregion betroffen. Granulome, Fisteln, Abszesse und Strikturen sind recht häufig. Dahingegen ist die Entzündung bei Colitis ulcerosa auf die Mukosa begrenzt und betrifft nur das Colon und Rektum. (Khor et al., 2011)

Die Ätiologie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist weitestgehend unbekannt. In Diskussion stehen das Zusammenspiel von Umweltfaktoren,

genetischer Prädisposition, Immunreaktionen sowie die intestinale Mikrobiota (Fiocchi, 1998, MacDonald et al., 2000, Khor et al., 2011, Coskun, 2014). In Studien konnte gezeigt werden, dass CED-Patienten eine signifikant reduzierte Biodiversität im intestinalen Mikrobiom besitzen sowie die Zusammensetzung der Mikrobiota instabil ist (Martinez et al., 2008). Insbesondere das Fehlen von anaeroben Bakterien wie *Bacteroidetes* und *Firmicutes* sowie eine Überrepräsentation von *Enterobactericae* wie *Escherichia coli* konnte in Stuhlproben bei CED-Patienten nachgewiesen werden (Ott et al., 2004). Im Darmlumen existieren eine Vielzahl an Mikroorganismen, welche in Koexistenz leben müssen. Hierbei muss der Organismus zum einen eine übermäßige Immunantwort gegenüber der kommensalen Darmbakterien verhindern, und zum anderen einen Schutz vor pathogenen Mikroorganismen in Form einer mukosalen Barriere bieten. Im Gesunden besteht die Darmmukosa aus zwei Schichten mit unterschiedlicher Durchlässigkeit. Die äußere Schicht ist durchlässiger und geeignet für das Bakterienwachstum, während die innere mukosale Schicht steril und undurchlässig ist. Bei CED-Patienten ist jedoch die Innenschicht der Mukosa mit Bakterien kolonisiert, was zur Inflammation führen kann (Van der Sluis et al., 2006, Johansson et al., 2008). Die Durchlässigkeit der epithelialen Barriere bei CED stört die Produktion antimikrobieller Peptide, führt zu defekter Mukusschicht, einer verstärkten Stimulation der pattern recognition Rezeptoren, was letztendlich zu einem Ungleichgewicht zwischen Immunantwort und Mikroorganismen führt (Wehkamp et al., 2005, Wehkamp and Stange, 2010). Durch die erhöhte Permeabilität kommen mehr Bakterien in Kontakt mit dem Darmepithel und dem Immunsystem, wodurch es zu einer überschießenden Immunantwort und längerfristig zu einer chronischen Inflammation des Intestinaltrakts kommen kann.

Des Weiteren besteht bei CED-Patienten eine dysregulierte Immunantwort gegenüber der kommensalen Bakterienflora, welche zur intestinalen Inflammation in genetisch prädisponierten Individuen führt. Im Gesunden sorgt eine gute Balance zwischen TH17-Zellen und Tregs für Schutz vor intestinaler Inflammation und vor Autoimmunreaktionen. Bei CED-Patienten ist diese Balance jedoch gestört. (Catana et al., 2015, Sartor, 2008)

1.6 MCPIP1 und IκBζ

Das Protein MCPIP1 (*Monocyte chemotactic protein-induced protein 1*), vom Gen *Zc3h12a* codiert, gehört zur Familie der Zinkfingerproteine. Als Endoribonuklease besitzt MCPIP1 RNase-Aktivität und ist daher in der Lage, mRNA (*messenger RNA*) abzubauen (Uehata and Akira, 2013). Die RNase-Aktivität richtet sich hierbei insbesondere gegen inflammatorische und virale mRNA-Transkripte wie z. B. IL-17-Rezeptoren. Über den Abbau der mRNA hemmt MCPIP1 den TLR-Signalweg, begrenzt die Differenzierung von TH17-Zellen und damit die IL-17-vermittelte Signaltransduktion (Garg et al., 2015, Monin et al., 2017). Experimentell konnte in MCPIP1-defizienten Mäusen eine Häufung von experimenteller Autoimmunenzephalitis, eine vermehrte Expression von IκBζ, eine starke Inflammation aufgrund verstärkter TLR-Signaltransduktion durch die Darmmikrobiota sowie eine verstärkte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-17 und IL-6 ermittelt werden (Garg et al., 2015). In MCPIP1-haploinsuffzienten Mäusen konnte bei Stimulation durch LPS und IL-17 eine verminderte MCPIP1-Expression nachgewiesen werden (Garg et al., 2015).

Der Transkriptionsfaktor IκBζ zählt zur Familie der IκB-Proteine, welche im Zellkern vorkommen und in Zusammenspiel mit NFκB die Transkription anderer Gene regulieren (Okamoto et al., 2010). Es wird durch das *Nfkbiz*-Gen codiert (Hildebrand et al., 2013, Okamoto et al., 2010). Die Aufgabe von IκBζ besteht darin, Immunantworten zu regulieren (Okamoto et al., 2010).
IκBζ kann über Ankyrin, einem Zytoskelett-Bestandteil, mit NFκB interagieren (Okamoto et al., 2010, Yamazaki et al., 2001). NFκB ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Expression zahlreicher Gene reguliert und damit einen Einfluss u.a. auf Immunantworten hat. Befinden sich die Zellen im Ruhezustand, liegt NFκB im Zytosol als inaktiver Komplex, inhibiert durch IκBs, vor. Werden IκBs durch entsprechende proinflammatorische Stimuli abgebaut, wird NFκB freigesetzt und in den Zellkern transportiert, wo dann die Aktivierung entsprechender Gene erfolgt (Yamazaki et al., 2001).
Wird IκBζ in naiven $CD4^+$ T-Zellen zusammen mit RORγt exprimiert, führt dies zu einer Differenzierung der $CD4^+$ T-Zellen hin zu TH17-Zellen. Zusammen mit

RORγt kann IκBζ an das IL-17-Gen binden und damit die Produktion von IL-17 erhöhen (Okamoto et al., 2010).

In Experimenten wurde gezeigt, dass in *Nfkbiz*$^{-/-}$ Mäusen keine Differenzierung zu TH17-Zellen und somit auch keine Entwicklung einer experimentellen Autoimmunenzephalitis, einem Modell für Multiple Sklerose, stattfindet. In *Nfkbiz*$^{-/-}$ Mäusen werden IL-17, IL-21, IL-22 und IL-23 in Milz und Lymphknoten in geringerem Maße produziert, was weniger IL-17^{+} IFNγ^{+} T-Zellen sowie weniger IL-17^{+} IFNγ^{-} T-Zellen zur Folge hat. IκBζ kommt auch in dendritischen Zellen vor, welche inflammatorische Zytokine produzieren für die Differenzierung der CD4^{+} T-Zellen zu TH17-Zellen (Okamoto et al., 2010). Wird ein TLR oder IL-Rezeptor durch z.B. Lipopolysaccharide (LPS) oder durch IL-1β stimuliert, wird folglich mehr IκBζ-mRNA gebildet. Bei vermehrter IκBζ-Expression steigt die Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 (Okamoto et al., 2010).

Liegt MCPIP1 in einer gewissen Konzentration vor, so wird *Nfkbiz*-mRNA abgebaut, sodass weniger IκBζ gebildet werden kann (Garg et al., 2015). Umgekehrt wird bei einer niedrigen Konzentration von MCPIP1 IκBζ vermehrt exprimiert. Somit wird davon ausgegangen, dass MCPIP1 proinflammatorische Vorgänge unterbindet, während IκBζ diese verstärkt (Garg et al., 2015).

1.7 Pathobiont vs. Symbiont

Kommensale Bakterien lassen sich in Symbionten und Pathobionten unterteilen. Während Symbionten nie eine Erkrankung des menschlichen Individuums auslösen und sogar nützlich für den Wirt sein können, können Pathobionten in prädisponierten Wirten zur Inflammation beitragen und pathologische Immunantworten hervorrufen (Round and Mazmanian, 2009, Chow and Mazmanian, 2010, Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2011). Ob Kommensale nun als Pathobiont oder Symbiont fungieren, hängt im Wesentlichen von einer Struktur des Bakteriums ab, dem Lipopolysaccharid (LPS). Das LPS ist in der äußeren Bakterienmembran gramnegativer Bakterien verankert und besteht aus drei Bereichen: Lipid A, einem Core-Oligosaccharid und einem Polysaccharid, dem O-Antigen (Alexander and Rietschel, 2001, Steimle et al., 2016). Die ausschlaggebende Struktur ist das Lipid A, welches sich zwischen den einzelnen Bakterienspezies hinsichtlich Acetylierung und Phosphorylierung unterscheidet.

Das bakterielle LPS bindet an TLR4, einem Transmembranprotein, auf dendritischen Zellen, und kann auf diese Weise mehr als 10^3 Gene aktivieren, was die Ausschüttung diverser Zytokine und Immunreaktionen zur Folge hat (Bjorkbacka et al., 2004). Je nach Struktur des Lipid A, wirkt das LPS entweder als starker Agonist oder als Antagonist bzw. nur schwacher Agonist. Das LPS als Agonist kann zu einer starken pro-inflammatorischen Immunantwort führen, während das LPS als schwacher Agonist bzw. Antagonist nur eine abgeschwächte pro-inflammatorische Reaktion bzw. sogar anti-inflammatorische Immunantwort auslösen kann (Raetz and Whitfield, 2002, Zahringer et al., 1994). Das LPS von *E. coli* gilt als starker Agonist, wohingegen das LPS von *B. vulgatus* als schwacher Agonist fungiert. Die Relation zwischen hoch endotoxisch wirkendem LPS (z. B. *E. coli*) und niedrig endotoxisch wirkendem LPS (z. B. *B. vulgatus*) hat Auswirkungen auf die immunologische Balance des Darms. Hoch endotoxisches LPS begünstigt die Induktion von pro-inflammatorischen TH1- und TH17-Zellen, während niedrig endotoxisches LPS sich zugunsten der Aktivierung der Tregs auswirkt, welche eine pro-inflammatorische Reaktion verhindern und zur Homöostase beitragen (Gronbach et al., 2014).

1.8 Vorarbeiten zum Thema

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass gnotobiotische IL-$2^{-/-}$ Mäuse, welche eine Monokolonisierung mit *B. vulgatus* erhielten, vor Colitis geschützt sind, wohingegen eine Monokolonisierung mit *E. coli* zu einer verstärkten TH1- und TH17-Antwort und damit zu einer Colitis führte (Muller et al., 2008). Eine Co-Kolonisierung der Mäuse sowohl mit *E. coli* als auch mit *B. vulgatus* schützte ebenso vor einer Colitis (Muller et al., 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dies nicht auf die Anzahl an *E. coli* zurückzuführen ist, sondern auf die durch *E. coli* induzierte Bildung von IFNγ, TNFα und IL-10 (Muller et al., 2008). *B. vulgatus* sorgt für die Entstehung semimaturer dendritischer Zellen ($CD40^{lo}$, $CD80^{lo}$, $MHC\text{-}II^{hi}$), was zu einer vermehrten Produktion von IL-6 sowie einer geringeren Produktion von TNFα führt, was letzten Endes vor der Entstehung einer Colitis schützt und immunregulatorisch wirkt (Muller et al., 2008). Dahingegen führt *E. coli* zur Entstehung maturer dendritischer Zellen ($CD40^{hi}$, $CD80^{hi}$, $MHC\text{-}II^{hi}$), was die

Produktion von IL-1, TNFα und TNFβ, IL-10 und IL-6 zur Folge hat (Muller et al., 2008). Mit Mikrobiota, welche eine niedrige Endotoxizität aufweist, kolonisierte und T-Zelltransplantierte Rag1$^{-/-}$ Mäuse weisen eine Homöostase auf, während mit hoch endotoxischer Mikrobiota kolonisierte keimfreie Rag1$^{-/-}$ Mäuse zur Ausbildung einer Darmentzündung nach T-Zelltransfer neigen. Ob Mäuse an einer Colitis erkranken, hängt im Wesentlichen von der Endotoxizität des LPS und damit des Bakteriums ab. Das LPS von *E. coli* wirkt hoch endotoxisch, während das LPS von *B. vulgatus* eine niedrige Endotoxizität aufweist (Gronbach et al., 2014).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass gramnegative Bakterien über ihr LPS die TLR-4 Rezeptorkaskade in Gang setzen. In Abhängigkeit der Stärke der agonistischen Aktivität des LPS kommt es letzten Endes zu einer proinflammatorischen oder aber einer protektiven Immunantwort des Körpers auf die Mikrobiota (Steimle et al., 2019).

Auf mRNA-Ebene konnte ebenso in Vorarbeiten gezeigt werden, dass *E. coli* zu einer erhöhten Produktion von IκBζ in dendritischen Zellen führt, während jene bei *B. vulgatus* schwächer ausgeprägt ist (Michaelis et al., 2020).

1.9 Hypothese

Die kommensalen Darmbakterien lassen sich, wie oben erläutert, in Pathobionten, welche vermehrt in einer Dysbiose vorkommen, und Symbionten, welche zu einer Homöostase beitragen, aufteilen. In der vorliegenden Doktorarbeit dient *E. coli* als Pathobiont, wohingegen *B. vulgatus* als Symbiont fungiert. Beide Bakterienarten zählen zu den gramnegativen Bakterien. Die Bakterien werden über PRRs wie z.B. Toll-like-Rezeptoren von dendritischen Zellen erkannt. Daraufhin laufen in der dendritischen Zelle verschiedene Prozesse ab, welche IκBζ und MCPIP1 hoch- bzw. herunterregulieren können. MCPIP1 kann, sofern es in Relation zu IκBζ überwiegt, dieses hemmen. In Abhängigkeit davon, in welcher Relation MCPIP-1 und IκBζ zueinander vorliegen, setzt die dendritische Zelle unterschiedliche Mengen an Interleukinen frei, welche naive CD4$^+$ T-Zellen stimulieren. Daraufhin wird die naive CD4$^+$ T-

Zelle zur Differenzierung in inflammatorische oder protektive Subtypen angeregt und schüttet dementsprechende Interleukine aus.

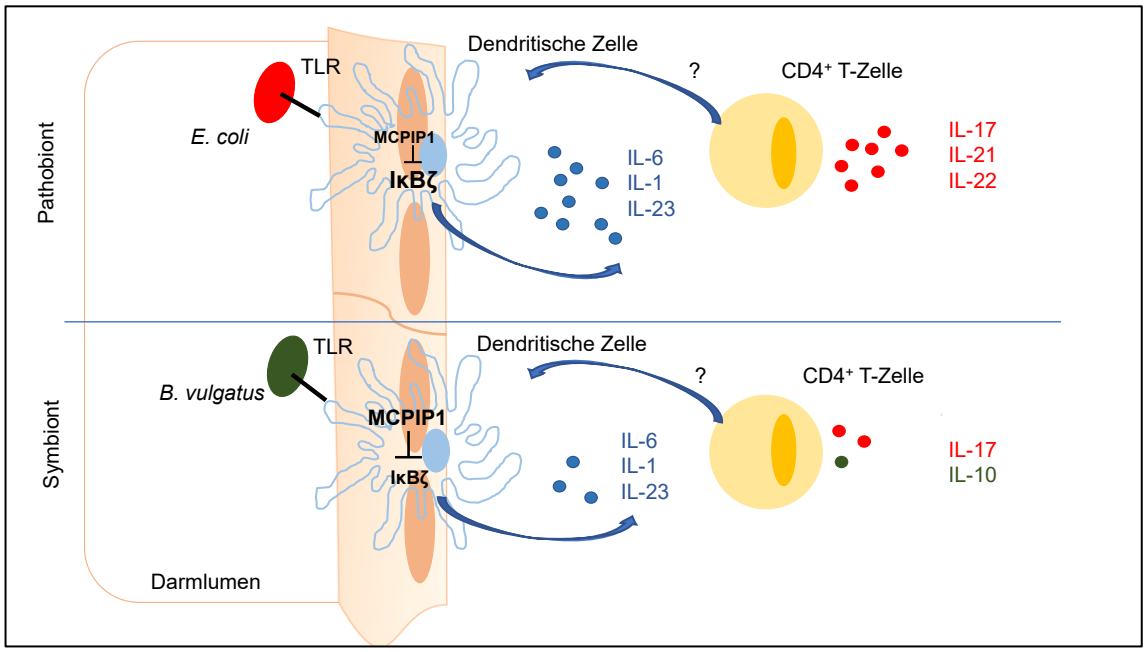

Abbildung 2 Hypothese der Doktorarbeit

Wie in Abbildung 2 dargestellt, wird angenommen, dass, wenn ein Pathobiont, in der Hypothese *E. coli*, im Darmlumen an die PRR der dendritischen Zelle bindet, IκBζ im Vergleich zu MCPIP-1 im Überschuss vorliegt, sodass es von MCPIP-1 nicht mehr effektiv inhibiert werden kann. Daraufhin werden u.a. IL-6, IL-23 und IL-1β freigesetzt, welche die naive $CD4^+$ T-Zelle zur Differenzierung zu TH17-Zellen anregen. Diese schüttet daraufhin proinflammatorische Zytokine aus (IL-17, IL-21, IL-22), welche zu einer TH17-vermittelten Autoimmunantwort führen können.

Bindet jedoch ein Symbiont, in der Hypothese *B. vulgatus*, im Darmlumen über PRR an die dendritische Zelle, liegt in dieser hypothetisch MCPIP-1 im Vergleich zu IκBζ im Überschuss vor und kann dadurch IκBζ effizient hemmen, sodass wiederum Interleukine nur in geringen Mengen freigesetzt werden. Dadurch werden naive $CD4^+$ T-Zellen wiederum zur Differenzierung zu protektiven TH17-Zellen (RORγt$^+$ IL-17$^+$ IL-10$^+$) angeregt und schütten andere Zytokine aus, welche zu einer protektiven TH17-Immunantwort führen können.

1.10 Ziele der Doktorarbeit

Die vorliegende Doktorarbeit geht der Frage nach, ob MCPIP-1 und IκBζ im Zeitverlauf durch kommensale Bakterien (*E. coli* als Pathobiont und *B. vulgatus* als Symbiont) reguliert werden, ob diese Regulation TLR-4 abhängig ist und inwiefern kommensale Darmbakterien die Proliferation und Polarisation naiver T-Zellen beeinflussen. Durch Aufklärung der Mechanismen der Immunantwort als Reaktion auf kommensale Darmbakterien erhofft man sich, die Pathogenese TH17-vermittelter Autoimmunerkrankungen, insbesondere jene der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, besser zu verstehen und dadurch in Zukunft neue, zielgerichtete Therapiemöglichkeiten, wie etwa die Verwendung symbiotischer Darmbakterien oder ihrer Bestandteile, entwickeln zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Gerät	***Hersteller***
C1000 Touch Thermal Cycler	BioRad
ELISA Washer 3 M8/4R	Tecan
Flow Cytometer LSR Fortessa™	BD Bioscience
Heraeus CO_2-Auto-Zero	Thermo Fisher Scientific
InfiniteR F50 Absorbance Microplate Reader	Tecan
LightCyclerR 480 Instrument II	Roche
NanoDrop™ One/One^C Mikrovolumen-UV/VIS Spektralphotometer	Thermo Fisher
Photometer	Eppendorf
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
Sterilbank	BDK
Zeiss Mikroskop Axiovert 135	Carl Zeiss AG
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf
-80°C Tiefkühlschrank	GFL GmbH
-20°C Tiefkühlschrank	Liebherr Premium
+4°C Kühlschrank	Liebherr Premium

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Material	***Hersteller***
12-Well-Platte	Thermo-Fisher
24-Well-Platte	Thermo-Fisher
6-Wellplatte	Thermo-Fisher
96-Well-Platte	Thermo-Fisher
Anaerogen	Thermo Scientific
EASYstrainer™ Zellsieb 100 µm	Greiner Bio-One
Eppendorf-Cup	Eppendorf
Facs-Tubes	Thermo-Fisher
Falcon™	Thermo-Fisher
Greiner-Röhrchen	Greiner Bio-One
Impföse	Greiner Bio-One
Injekt® 10 mL Einmalspritze	B. Braun
Sterican® Gr. 20 G 27 x 3/4““ / 0,40 x 20 mm, grau	B. Braun
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One
Zellschaber	Corning

2.1.3 Medien und Puffer

Tabelle 5: Medien

Medium	***Zusammensetzung***
BHI-Medium	12,5 g Brain infusion solids 5 g Beef heart infusion solids 10 g Proteosepepton 2 g Glucose 5 g Natriumchlorid 2,5 g Dinatriumhydrogenphosphat
DC-Medium	RPMI 1640 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 0,5% β-Mercaptoethanol 1% nicht-essentielle Aminosäuren 20 mL GM-CSF

LB-Medium	10 g L-1 Trypton 10 g L-1 NaCl 5 g L-1 Hefeextrakt
Separationsmedium	HBSS 5%FCS 2 mM EDTA
Stimulationsmedium	RPMI 10% FCS 25mM HEPES 1% Penicillin/Streptomycin 1% nicht-essentielle Aminosäuren 0,5 % β-Mercaptoethanol 1% Na-Pyruvat
T-Zell-Medium	RPMI 10% FCS 1M HEPES 1% Penicillin/Streptomycin 1% nicht-essentielle Aminosäuren 1% Natrium-Pyruvat 0,5 % β-Mercaptoethanol
Verdaumedium	RPMI 1640 10% FCS 58.27 µl DNase (27460 U/ml) 300 µl Collagenase (0.1 g/ml)

Tabelle 6: Puffer

Puffer	***Zusammensetzung***
Erythrozyten-Lysepuffer	8.30 g L-1 NH_4Cl 1 g L-1 $NaHCO_3$ 3.7 g L-1 Na_2EDTA
HBSS/FCS	95% HBSS 5% FCS
Perm/Wash-Puffer	PBS 3% FCS 10% Saponin
PBS/FCS	99% PBS 1% FCS
RLT-Lysepuffer	RLT 1% β-Mercaptoethanol

2.1.4 Lösungen, Chemikalien und Agar

Tabelle 7: Lösungen und Chemikalien

Lösungen/Chemikalien	***Hersteller***
Collagenase	Sigma-Aldrich
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences
DNase	Sigma-Aldrich
EDTA	Biochrom
Fc-Block	Eigene Herstellung
FCS	Sigma-Aldrich
GM-CSF	Eigene Herstellung
HBSS	Thermo Fisher
HEPES	Biochrom
Leukozyten-Aktivierungs-Cocktail	BD Bioscience
LPS	Calbiochem
MangoMix™	Bioline
Natrium-Pyruvat	Biochrom
Nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom
Ova-Peptid	EMC
PBS	Thermo Fisher
PFA	Sigma-Aldrich
RLT-Puffer	Quiagen
RNase-Free DNase Set	Quiagen
RPE-Puffer	Quiagen
RPMI	Thermo Fisher
RW-Puffer	Quiagen
Saponin	Sigma-Aldrich
TLR4 Inhibitor TAK-242	Sigma-Aldrich
Trypanblau	1 % Trypanblau 2,5 % $NaHCO_3$
Tween20	Biochrom
UltraComp eBeads™	eBioscience
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

Tabelle 8: Agar

Agar	*Hersteller*
BHI	Eigene Herstellung
Chloramphenicol-LB	Eigene Herstellung
Columbia Agar mit 5% Schafsblut	Biomerieux
Columbia CNA-Agar mit 5% Schafsblut	Biomerieux
Endo	Eigene Herstellung
Kanamycin-LB	Eigene Herstellung

2.1.5 Antibiotika

Tabelle 9: Antibiotika

Antibiotikum	*Hersteller*
Gentamycin	Sigma Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Biochrom

2.1.6 Kits

Tabelle 10: Kits

Kit	*Hersteller*
Naïve CD4$^+$ T Cell Isolation Kit	Miltenyi
QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit Qiagen	QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit Qiagen
RNeasy Mini Kit Qiagen	RNeasy Mini Kit Qiagen
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Thermo Fisher

2.1.7 Antikörper

Tabelle 11: Antikörper

Fluoreszenz	*Antikörper*	*Reaktivität*	*Klon*	*Hersteller*
APC	CD11c	Maus	HL3	BD Biosciences
	CD3e	Maus	145-2C11	BD Biosciences
	CD25	Maus	PC61	BD Biosciences

	MHC-II (I-Ab)	Maus	AF6-120.1	BD Biosciences
	RORγt	Maus	Q31-378	BD Biosciences
APC-Cy7	CD45	Maus	30-F11	BD Biosciences
	FVD780	intrazellulär	-	eBioscience
	IL-17A	Maus	TC11-18H10	BD Biosciences
BV421 (Pacific Blue)	CD4	Maus	GK-1.5	BD Biosciences
	FoxP3	Maus	MF23	BD Biosciences
	FVD450	intrazellulär	-	eBioscience
	MHC-II	Maus	AF6-120.1	BD Biosciences
	RORγt	Maus	Q31-378	BD Biosciences
	T-bet	Maus	4B10	BioLegend
BV510 (AmCyan)	CD103	Maus	M290	BD Biosciences
	CD4	Maus	GK-1.5	BD Biosciences
	FVD506	intrazellulär	-	eBioscience
	IL-10	Maus	JES5-16E3	BD Biosciences
BV605 (Qdot)	CD11b	Maus	M1/70	BD Biosciences
	CD4	Maus	GK-1.5	BD Biosciences
	Ova-TCR (Vβ5.1, 5.2 TCR)	Maus	MR9-4	BD Biosciences
FITC	MCPIP1	Maus	polyclonal	biorbyt
	IFNγ	Maus	XMG1.2	BD Biosciences
PE	CD45R	Maus	16A	BD Biosciences
	CD64	Maus	X54-5/7.1	BD Biosciences
	CTLA-4	Maus	UC10-4F10-11	BD Biosciences
	IL-17 A	Maus	TC11-18H10	BD Biosciences
	IL-4	Maus	11B11	BD Biosciences
	Ly6C/G	Maus	GR-1/RB-68C5	BD Biosciences

PE-Cy7	CD11c	Maus	HL3	BD Biosciences
	FoxP3	Maus	FJK-16s	eBioscience
	GATA-3	Maus	L50-823	BD Biosciences
	IFNγ	Maus	XMG1.2	BD Biosciences
PerCP-Cy 5.5	CD25	Maus	PC61	BD Biosciences
	IκBζ	Maus	LK2NAP	eBioscience

2.1.8 Primer

Tabelle 12: Primer

Gen	***NCBI Gene ID***	***Sequenz***
Actb- **β-Actin**	11461.0	F: CCCTGTGCTGCTCACCGA R: ACAGTGTGGGTGACCCCGTC
Nfkbiz- **IκBζ**	80859.0	F: GCTCCGACTCCTCCGATTTC R: GAGTTCTTCACGCGAACACC
Zc3h12a- **MCPIP1 A2**	230738.0	F: GCCTATCACAGACCAGCACA R: ACGTGTCATTGGAGACCACC
CTLA-4- **CTLA-4 HL3**	12477.0	F: GCTTCCTAGATTACCCCTTCTGC R: CGGGCATGGTTCTGGATCA

2.1.9 Bakterien

Tabelle 13: Bakterien

Bakterium	***Hersteller***
***B. vulgatus* mpk**	Max von Pettenkofer Institut München
***E. coli* mpk2**	Max von Pettenkofer Institut München

2.1.10 Mäuse

Tabelle 14: Mäuse

Genotyp	***Herkunft***
C57BL/6	Charles River, USA
OT-II	Eigene Zucht

Rag1$^{-/-}$	Eigene Zucht
TLR2$^{-/-}$ x TLR4$^{-/-}$	Eigene Zucht
TLR4$^{-/-}$	Eigene Zucht

2.2 Methoden

2.2.1 Zellisolation und Zellkultur

2.2.1.1 Isolation und Kultivierung von knochenmarksgereiften dendritischen Zellen *(BMDC)*

Für die Isolation der knochenmarksgereiften Progenitorzellen wurden weibliche, 6 bis 16 Wochen alte Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden durch Begasung mit CO_2 und anschließendem Genickbruch getötet. Zur Isolation des Knochenmarks wurden jeweils beidseits Femur und Tibia der Mäuse verwendet. Die Femur und Tibia umgebende Haut und Muskelschicht wurde entfernt und das Knochenmark anschließend steril mit einer 10 mL Spritze und einer 0.4 x 20 mm G-Kanüle mit sterilem PBS durch ein 100 µm Sieb gespült und aufgefangen. Im Folgenden wurde die Zellsuspension bei 400 x *g* für 5 min zentrifugiert. Der Überstand nach dem Zentrifugieren wurde verworfen und die Zellpellets mit jeweils 10 mL des DC-Mediums resuspendiert. Im Folgenden erfolgte die Zählung der vitalen dendritischen Zellen mittels einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop. Hierzu wurde zunächst eine 1:10 Verdünnung der Zellsuspension in Trypanblau angefertigt. Nach der Zählung der Zellen wurden jeweils 10 mL des DC-Mediums und jeweils $2x10^6$ Zellen in sterile Petrischalen ausgesät. Die ausgesäten Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO_2 für zwei Tage inkubiert. Am dritten Tag wurden pro Petrischale 10 mL frisches DC-Medium hinzugefügt. An Tag 6 wurden aus jeder Petrischale 10 mL des DC-Mediums entfernt, gepoolt und bei 400 x *g* für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 mL frischem DC-Medium resuspendiert und schließlich zurück in die Petrischalen gegeben. In jede Petrischale wurden zusätzlich 10 mL frisches DC-Medium hinzugefügt. Durch die Kultivierung reifen die aus dem

Knochenmark isolierten Progenitorzellen zu dendritischen Zellen heran und können an Tag 7 geerntet und für Experimente verwendet werden.

2.2.1.2 Isolation von naiven $CD4^+$-T-Zellen

Für die Isolation naiver $CD4^+$-T-Zellen wurden weibliche 6 bis 16 Wochen alte Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden durch Begasung mit Kohlenstoffdioxid und anschließendem Genickbruch getötet. Folglich wurden die Milzen der Tiere herauspräpariert, von Fett befreit und in mit 10 mL PBS (mit $MgCl_2$, $CaCl_2$/FCS (1%) gefüllte Falcons überführt. Anschließend wurden die Milzen und PBS/FCS (1%) in ein abgekochtes Sieb gegeben und mittels eines sterilen Spritzenstempels durch das Sieb in eine Petrischale passiert. Die Milzzellsuspension wurde durch einen 100 µm-Filter in einen Falcon pipettiert, 5 min bei 400 x *g* zentrifugiert und der Überstand verworfen. Pro Milz wurden 4 mL ELP hinzugegeben und das Zellpellet resuspendiert. Bei kontinuierlicher Rotation wurde die Zellsuspension für 7 min bei RT inkubiert und folglich mit 16 mL eiskaltem PBS/FCS (1%) pro Milz aufgefüllt, erneut durch einen 100 µm-Filter in ein Falcon pipettiert und auf 50 mL nochmals mit eiskaltem PBS aufgefüllt. Nach abermaliger Zentrifugation für 5 min bei 400 x *g* wurde der Überstand abgesaugt und alle Zellpellets in 5 mL PBS/FCS (1%) gepoolt. Nach Auszählen der Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde nochmals bei 400 x *g* für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde pro 10^7 Zellen mit 40 µL PBS/FCS (1%) resuspendiert, mit 20 µL Biotin-Antibody-Cocktail gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Pro 10^7 Zellen wurden 20 µL Anti-Biotin-MicroBeads, 20 µL PBS/FCS (1%) und 10 µL Anti-CD44-MicroBeads zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert, danach auf 50 mL mit eiskaltem PBS/FCS (1%) aufgefüllt und für 10 min bei 300 x *g* bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 9 mL PBS/FCS (1%) (x mL = 3 · n; n = verwendete Anzahl an Säulen) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf die mit PBS/FCS (1%) angefeuchteten Säulen des MACS-Apparates pipettiert, mit jeweils 9 mL PBS/FCS (1%) gespült und in einem 15 mL Falcon aufgefangen. Es erfolgt eine Zentrifugation für 5 min bei 400 x *g*, der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 0.5 mL kaltem

PBS/FCS (1%) resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, die Zellsuspension abermals zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde entsprechend der Anzahl an geplanten T-Zelltransplantationen für $5x10^5$ Zellen pro 100 µL in PBS (s. 2.2.4.2) bzw. für die Co-Kultur (s. 2.2.3.2) in PBS/FCS (1%) resuspendiert.

Ein Teil der isolierten $CD4^+$-T-Zellen wurde für die Kontrolle der Naivität der T-Zellen mittels FACS verwendet (siehe 2.2.5).

2.2.2 Kultivierung und Quantifizierung von Bakterien

2.2.2.1 Kultivierung von *B. vulgatus* mpk

Für die Kultivierung wurden 50 µL des *B. vulgatus* mpk-Stocks in 5 mL LB-Medium mit Schweineleber gegeben und für 3 Tage anaerob bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 mL der Bakteriensuspension zu 45 mL BHI-Medium gegeben und nochmals für einen Tag anaerob bei 37°C kultiviert.

2.2.2.2 Kultivierung von *E. coli* mpk

Für die Kultivierung wurden 50 µL des *E. coli* mpk-Stocks in 5 mL LB-Medium überführt und bei 37°C aerob und schüttelnd über Nacht inkubiert. Der Übernachtkultur wurden 300 µL entnommen, in 20 mL frisches LB-Medium überimpft und nochmals für 2,5 Stunden bei 37°C aerob und schüttelnd kultiviert.

2.2.2.3 Quantifizierung der Bakterien

Die Bakteriensuspension wurde bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Bakterien wurden anschließend in sterilem PBS resuspendiert und folglich quantifiziert. Hierzu wurde im Photometer eine 1:20-Verdünnung der Bakterien bei OD_{600} gemessen. Eine OD_{600} von 1 entspricht $5x10^8$ Bakterien pro mL.

2.2.2.4 Trinkwasserzubereitung mit Bakterien für *in vivo*-Mausmodelle

Die Kultivierung und Quantifizierung der Bakterien erfolgten wie oben erwähnt. Pro Trinkflasche wurde ein Volumen von 200 mL benötigt. Eine finale

Konzentration von $1x10^8$ Bakterien/mL wurde in 200 mL autoklaviertem Trinkwasser zubereitet.

2.2.2.5 Bestimmung der bakteriellen koloniebildenden Einheit *(CFU)*

Fäzes der Mäuse wurden gesammelt, gewogen, in 1000 µL sterilem PBS gelöst und in verschiedenen Verdünnungen auf KV-, Endo-, CNA-, Blut- und BHI-Agarplatten ausplattiert, um die koloniebildenden Einheiten pro g Fäzes *(CFU)* zu bestimmen oder die Keimfreiheit bzw. die erfolgreiche Kolonisation mit *B. vulgatus* mpk bzw. *E. coli* mpk nachzuweisen.

2.2.3 Stimulation

2.2.3.1 Stimulation knochenmarksgereifter dendritischer Zellen *(BMDC)*

Hierbei wurden zunächst die kultivierten knochenmarksgereiften dendritischen Zellen (s. 2.2.1.1) mit einem Zellschaber aus den Petrischalen gelöst und die Zellsuspension bei 400 x *g* für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 mL Medium resuspendiert. Anschließend wurden die vitalen dendritischen Zellen in einer 1:10 Verdünnung in Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und $2x10^6$ Zellen in einer 6-Wellplatte ausgesät. Mit DC-Medium wurde auf 2000 µL aufgefüllt und pro Well 2 µL Gentamycin hinzugefügt. Die Zellen wurden 1 Stunde lang bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Bakterien quantifiziert (s. 2.2.2.3) und anschließend die Zellen für 2 Stunden, 4 Stunden oder 16 Stunden mit der Bakteriensuspension, entsprechend einer Mulitplizität der Infektion (mulitplicity of infection, MOI) von 1 bzw. dem Bakterien-LPS (100 ng/mL) stimuliert. Bei den Zellen, welche zusätzlich mit TAK242, einem TLR4-Inhibitor, stimuliert wurden, wurde dieser 1 Stunde vor der bakteriellen Stimulation in der Konzentration von 10 µM hinzugegeben.

Nach Beenden der Stimulationszeit wurden die Zellen mit einem Zellschaber aus den Wells gelöst, in Eppendorfgefäße überführt und bei 400 x *g* für 5 min zentrifugiert, um sie für die weitere Analyse zu verwenden.

2.2.3.2 Stimulation und Co-Kultivierung dendritischer Zellen mit T-Zellen

Hierbei wurden mit *B. vulgatus* mpk bzw. *E. coli* mpk stimulierte dendritische Zellen von WT-Mäusen mit naiven T-Zellen aus OT-II Mäusen co-kultiviert. Der Versuch diente zur Untersuchung der Polarisation und Proliferation naiver T-Zellen und Expression ihrer Interleukine bei Aktivierung durch *B. vulgatus* mpk bzw. *E. coli* mpk-stimulierte dendritische Zellen. T-Zellen von OT-II-Mäusen exprimieren einen OT-II-T-Zellrezeptor, der spezifisch für das Hühner-Ovalbumin 323-339 (Ova-Peptid) ist. Ovalbumin ist für das Immunsystem ein Antigen, weshalb es von dendritischen Zellen erkannt und mittels MHC-II-Molekülen auf der Oberfläche der dendritischen Zellen den naiven, $CD4^+$ T-Zellen präsentiert wird. Das durch MHC-II präsentierte Ovalbumin bindet spezifisch an OT-II-T-Zellrezeptoren und sorgt somit für eine Aktivierung der naiven, $CD4^+$ T-Zelle (Robertson et al., 2000).

Zur Bestimmung der Proliferation wurde das CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit verwendet.

Es ergab sich ein Versuchsaufbau mit folgenden Kombinationen der einzelnen Bestandteile:

Tabelle 15: Kombinationsschema Co-Kultur

Gruppe	**Dendritische Zellen**	**T-Zellen**	**CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit**	**Ova-Peptid**
1	x	x	x	x
2	x	x	x	
3	x	x		x
4	x	x		
5	x			x
6	x			

Zunächst wurden BMDCs wie in 2.2.1.1 beschrieben isoliert und kultiviert. An Tag 7 wurden die dendritischen Zellen geerntet und bei 400 x *g* für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets jeder Maus in 5 mL Stimulationsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in einer 1:10 Verdünnung mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt, $5x10^5$ dendritische Zellen pro Well in 500 µL Stimulationsmedium in einer 24-Wellplatte ausgesät und 1 h ruhen gelassen.

Währenddessen wurden die kultivierten Bakterien *B. vulgatus* mpk (s. 2.2.2.1) und *E. coli* mpk (s. 2.2.2.2) quantifiziert (s. 2.2.2.3). Die dendritischen Zellen wurden mit der Bakteriensuspension mit einer MOI von 1 stimuliert, 5 µL einer 1:10 Vorverdünnung von Gentamycin in jedes Well pipettiert und bei 37°C für 16 h inkubiert. Nach Ablauf der Stimulation wurden die dendritischen Zellen abgekratzt und pro Well 1 x 10^5 Zellen (entspricht 100 µL der Zellsuspension) in eine 96-Wellplatte überführt.

Nun wurden jeweils 10 µL Ova-Peptid in einer 1:20 Verdünnung zu den Zellen in die Wells pipettiert, um eine Konzentration von 10 µg/mL zu erreichen, und die Zellen anschließend für 2 h bei 37°C inkubiert.

In dieser Zeit erfolgte die Isolation der T-Zellen aus 10 OT-II-Mäusen (s. 2.2.1.2). Die isolierten und gezählten naiven $CD4^+$-T-Zellen wurden in PBS/FCS (1%) resuspendiert. Die eine Hälfte der Zellen wurden als ungefärbte Zellkontrolle beiseite genommen, die andere Hälfte wurde mit CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit gefärbt. Hierbei wurde das CellTrace™ CFSE Cell Reagent 1:1000 in der zu färbenden Zellsuspension (für 5 µM Working Concentration) verdünnt und 10 min bei 37°C lichtgeschützt im Wasserbad mit gelegentlichem Durchmischen inkubiert. Anschließend wurde mit eiskaltem FCS auf das zehnfache Färbevolumen aufgefüllt und gemischt, um noch freie CSFE-Reste zu entfernen. Die Zellsuspension wurde bei 400 x *g* für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 mL vorgewärmtem Stimulationsmedium resuspendiert. Nach Wiederholen des Waschvorgangs wurde das Zellpellet in 1 mL Stimulatonsmedium resuspendiert. Die T-Zellen wurden gezählt. Nach Ablauf der Inkubation der dendritischen Zellen mit Ova-

Peptid wurde die 96-Wellplatte bei 400 x *g* für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt und die Zellpellets in 100 µL Stimulationsmedium resuspendiert. In die Wells wurden jeweils 2×10^5 Zellen (entspricht 100 µL der T-Zellsuspension) mit bzw. ohne CFSE-Färbung pipettiert. Daneben ergaben sich 4 Kontrollgruppen:

1) eine Co-Kultur von dendritischen Zellen mit CSFE-markierten T-Zellen, jedoch ohne das für die Aktivierung des T-Zellrezeptors notwendige Ovalbumin. Hier wäre demnach keine T-Zellaktivierung zu erwarten.
2) eine Co-Kultur von dendritischen Zellen mit T-Zellen, jedoch ohne CFSE-Markierung und ohne Ovalbumin-Inkubation, um zeigen zu können, dass keine T-Zellaktivierung und Proliferationsmessung erfolgen kann.
3) mit Ovalbumin inkubierte dendritische Zellen.
4) dendritische Zellen.

Die 96-Wellplatte wurde lichtgeschützt bei 37°C für 24h inkubiert.

Für die T-Zellkontrolle wurden einmal ungefärbte T-Zellen sowie mit CFSE-gefärbte T-Zellen nach 2.2.5 fixiert und lichtgeschützt bis zur Überprüfung der Naivität der T-Zellen mittels FACS-Analyse bei 4°C gelagert.

An Tag 11 wurde in die Wells der cokultivierten Zellen jeweils 2 µL einer 1:5 Verdünnung des Leukozyten-Aktivierungscocktails (LAC) für eine finale Konzentration von 2 µL LAC pro mL Zellkultur pipettiert und die Zellen anschließend bei 37°C für 4 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen bei 400 x *g* für 5 min zentrifugiert, die Überstände in neue Eppendorf-Cups überführt und bei -20°C weggefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt in einem weiteren Versuch dendritische Zellen mit den Überständen stimulieren zu können. Die Zellpellets wurden nach 2.2.5 fixiert und für die FACS-Analyse gefärbt.

2.2.3.3 Stimulation von WT-BMDCs mit Überständen aus stimulierten WT-BMDCs

Hierbei wurden gepoolte, steril filtrierte Überstände der 16 h mit PBS, *B. vulgatus* und *E. coli* stimulierten WT-BMDCs verwendet. Neu isolierte WT-BMDCs wurden

für 2 h, 4 h und 16 h mit 400µL in insgesamt 1 mL Stimulationsvolumen der oben genannten steril filtrierten Überständen stimuliert. Nach dem jeweiligen Stimulationszeitpunkt wurde nach 2.2.5 sowie 2.2.6 vorgegangen.

2.2.4 In vivo-Modelle

Alle Tierversuche, die für diese Arbeit durchgeführt wurden, wurden vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt unter den Nummern H1/15, §4 09.01.2015, §4 14.06.2017 und §4 28.09.2017.

2.2.4.1 Monokolonisierung gnotobiotischer C57BL/6-Mäuse mit Kommensalen und anschließende Isolation der Zellen aus mesenterialen Lymphknoten und intestinaler Lamina propria

Um den Einfluss kommensaler Darmbakterien auf die T-Zellpolarisation und auf die Expression von MCPIP1 und IκBζ hin zu untersuchen, wurde ein *in vivo*-Mausmodell durchgeführt. Hierzu wurden 6 bis 8 Wochen alte, weibliche und männliche keimfreie C57BL/6-Mäuse verwendet. Die Tiere wurden in drei Gruppen à 5 Mäuse aufgeteilt:

Tabelle 16: Versuchsgruppen in vivo-Versuch 1

Gruppe	**Kolonisierung**
1	Keimfreie Kontrollgruppe
2	*B. vulgatus* mpk
3	*E. coli* mpk

Gruppe 1 war die Kontrollgruppe, welche keimfrei blieb. Gruppe 2 bekam *B. vulgatus* mpk und Gruppe 3 *E. coli* mpk in einer Konzentration von jeweils $1x10^8$ Bakterien/mL über das Trinkwasser für die Dauer eines Tages verabreicht. Vor Beginn des Experiments sowie nach einer Woche wurden Fäzesproben der Tiere gesammelt, in sterilem PBS verdünnt und auf Endo-, BHI-, CNA-, Blut- und KV-Agarplatten ausplattiert, um die Keimfreiheit bzw. Kolonisation mit *B. vulgatus* mpk respektive *E. coli* mpk zu bestätigen. Auch das verabreichte Trinkwasser wurde auf seine Keimfreiheit bzw. die Kolonisation mit *B. vulgatus* mpk bzw. *E. coli* mpk hin überprüft.

Die Tiere wurden nach 2 Wochen der Kolonisierung für die Analyse mittels Begasung durch CO_2 und Genickbruch getötet. Caecumfäzes wurden entnommen, gewogen und auf Endo- und KV-Agarplatten ausplattiert, um die Kolonisation bzw. Keimfreiheit der Tiere nachzuweisen.

Mesenteriale Lymphknoten wurden entnommen, in PBS/FCS (1%) gegeben und durch ein Zellsieb passiert. Die Zellsuspension wurde bei 400 x *g* bei 4°C für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 1 mL PBS/FCS resuspendiert und die Zellen gezählt. Bis zur Fixierung wurden die Zellen bei 4°C gelagert.

Für die Isolation von DC und T-Zellen aus der Lamina propria wurden Coecum, Colon und Dünndarm entnommen und jeweils ca. 1 cm für die RNA-Isolation verwendet. Das Ileum wurde von Peyers-Plaques und Fett befreit und getrennt von Coecum und Colon verarbeitet. Das isolierte Darmgewebe wurde längs aufgeschnitten, in Stücke von ca. 1,5 cm Länge geschnitten und in Schottflaschen mit jeweils 30 mL Separationsmedium gegeben. Für 20 min bei 37°C wurden die Darmabschnitte rührend im Wasserbad inkubiert, anschließend durch ein Zellsieb geschüttet, in 30 mL frisches Separationsmedium überführt und nochmals bei 37°C für 20 min rührend im Wasserbad inkubiert. Die Flaschen wurden kurz gevortext, der Inhalt wurde erneut durch ein Zellsieb geschüttet und die Darmstücke in kleinere Stücke geschnitten. Diese wurden in jeweils 20 mL Verdaumedium überführt und bei 37°C für 15 min im Wasserbad inkubiert. Der Inhalt wurde 20 s gevortext, durch ein Zellsieb geschüttet und mit eiskaltem HBSS/FCS (1%) auf 50 mL aufgefüllt. Der Durchfluss wurde bei 400 x *g*, 10 min und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 50 mL eiskaltem HBSS/FCS resuspendiert. Nach weiterer Zentrifugation für 10 min bei 400 x *g* wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 mL PBS/FCS (1%) resuspendiert. Mithilfe der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen gezählt und bis zur Fixierung bei 4°C gelagert. Für die Analyse der dendritischen Zellen wurde nach 2.2.5 fortgefahren. Für die Analyse der T-Zellpopulationen erfolgte noch eine Aktivierung der T-Zellen (siehe 2.2.4.3).

2.2.4.2 Monokolonisierung gnotobiotischer Rag1$^{-/-}$ Mäuse mit Kommensalen und T-Zelltransfer und anschließende Isolation der Zellen aus mesenterialen Lymphknoten und intestinaler Lamina propria

Um den Einfluss kommensaler Darmbakterien auf die T-Zellpolarisation und die Expression von MCPIP1 und IκBζ in Unabhängigkeit von B-Zellen zu untersuchen, wurde ein *in vivo*-Mausmodell durchgeführt. Hierzu wurden 6 bis 8 Wochen alte keimfreie Rag1$^{-/-}$ Mäuse verwendet und in 6 Gruppen eingeteilt:

Tabelle 17: Versuchsgruppen in vivo-Versuch 2

Gruppe	**Behandlung**
1	Keimfrei
2	*B. vulgatus* mpk + T-Zellen
3	*E. coli* mpk + T-Zellen
4	Keimfrei + T-Zellen
5	*B. vulgatus* mpk
6	*E. coli* mpk

Die Kolonisierung erfolgte für einen Tag mit *B. vulgatus* mpk bzw. *E. coli* mpk in einer Konzentration von jeweils 1x10^8 Bakterien/mL über das Trinkwasser. Wöchentlich wurden Fäzesproben gesammelt und auf CNA-, BHI-, Blut-, Endo- und KV-Agarplatten ausplattiert, um die Keimfreiheit bzw. erfolgreiche Kolonisierung zu überprüfen und mögliche Kontaminationen auszuschließen. Auch das verabreichte Trinkwasser wurde auf seine Keimfreiheit bzw. die Kolonisation mit *B. vulgatus* mpk bzw. *E. coli* mpk hin überprüft.

Nach 4 Wochen wurden naive CD4$^+$-T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen isoliert (siehe 2.2.1.2) und in die Versuchsgruppen 2, 3 und 4 intraperitoneal in einer Konzentration von 5x10^5 T-Zellen pro 100 µL Zellsuspension appliziert. 2 Wochen nach erfolgter T-Zelltransplantation erfolgte die Analyse.

Die Tiere wurden für die Analyse mittels Begasung durch CO_2 und Genickbruch getötet. Coecumfäzes wurden entnommen und auf Endo- und KV-Agarplatten ausplattiert, um die Kolonisation bzw. Keimfreiheit der Tiere nachzuweisen.

Mesenteriale Lymphknoten wurden entnommen, in PBS/FCS (1%) gegeben und durch ein Zellsieb passiert. Die Zellsuspension wurde bei 400 x *g* bei 4°C für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 1 mL PBS/FCS resuspendiert und die Zellen gezählt. Bis zur Fixierung wurden die Zellen bei 4°C in PBS/FCS (1%) gelagert.

Coecum, Colon und Dünndarm wurden entnommen und längs aufgeschnitten, in Stücke von ca. 1,5 cm Länge geschnitten und in jeweils 20 mL Separationsmedium gegeben. Für 20 min bei 37°C wurden die Darmabschnitte im Wasserbad inkubiert, anschließend für 10 s gevortext und durch ein Zellsieb geschüttet, in 20 mL frisches Separationsmedium überführt und nochmals bei 37°C für 20 min im Wasserbad inkubiert. Der Inhalt wurde erneut gevortext, durch ein Zellsieb geschüttet, die Darmstücke in 20 mL Waschpuffer gegeben und für 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Der Inhalt wurde abermals in ein Zellsieb gegeben und in kleinere Stücke geschnitten. Diese wurden in jeweils 20 mL Verdaumedium überführt und bei 37°C für 15 min im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde es 20 s gevortext, durch ein Zellsieb geschüttet und mit eiskaltem HBSS/FCS auf 50 mL aufgefüllt. Der Durchfluss wurde bei 400 x *g*, 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 50 mL eiskaltem HBSS/FCS resuspendiert. Nach weiterer Zentrifugation für 10 min bei 400 x *g* wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 mL PBS/FCS resuspendiert. Mithilfe der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen gezählt, jeweils 1 x 10^6 Zellen in zwei Eppendorfgefäße für die DC- bzw. T-Zellproben überführt und bis zur Fixierung bei 4°C gelagert. Für die Analyse der dendritischen Zellen wurde nach 2.2.5 fortgefahren. Für die Analyse der T-Zellpopulationen in den T-zelltransplantierten Gruppen erfolgte noch eine Aktivierung der T-Zellen (siehe 2.2.4.3).

2.2.4.3 T-Zellaktivierung

Dieser Schritt dient der Generierung einer primären Zytokinantwort der T-Zellen. Die Zellsuspensionen von Colon, Coecum, Dünndarm und mesenterialen Lymphknoten für die Analyse der T-Zellpopulationen wurden für 5 min bei 400 x *g* zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellpellets in

jeweils 1 mL T-Zellmedium und 2 µL LAC resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 24-Well-Platten ausgesät und für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert (siehe 2.2.5).

2.2.5 Fixierung und intra-/extrazelluläre Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie (FACS)

Die Zellen wurden bei 400 x *g* 5 min lang zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellpellets wurden in 100 µL Fc-Block resuspendiert und auf eine 96-Wellplatte übertragen. Die Zellen wurden in diesem Fc-Block, welcher nicht-spezifische Bindungen von Immunglobulinen an Fc-Rezeptoren blockieren soll, für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen bei 400 x *g* für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden in 100 µL PBS resuspendiert und abermals bei 400 x *g* 5 min zentrifugiert, um die Zellen zu waschen. Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen mit Ausnahme einer ungefärbten Kontrolle in 100 µL des 1:1000 in PBS verdünnten FVD resuspendiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Der FVD ermöglicht eine Lebend-/Totfärbung der Zellen. Bei toten Zellen kann der Farbstoff leichter durch die Membran diffundieren, irreversibel an Zellstrukturen binden und sorgt so für eine kräftigere Färbung der toten Zellen im Gegensatz zu den lebenden Zellen, welche weniger Farbstoff aufnehmen und so eine geringere Fluoreszenzintensität vorhanden ist. Anschließend erfolgte wiederum eine Zentrifugation bei 400 x *g* für 5 min. Die Zellpellets wurden in 200 µL Cytofix/Cytoperm resuspendiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Cytofix/Cytoperm ermöglicht eine Fixierung der Zellen, um die Struktur der Zellen zu erhalten und führt gleichzeitig zu einer stärkeren Permeabilisierung der Zellen, um sie für die spätere intrazelluläre Färbung mit Antikörpern durchlässig zu machen. Nach abermaliger Zentrifugation bei 400 x *g*, 5 min, erfolgte das Resuspendieren der Zellpellets in 100 µL Perm/Wash-Puffer.

Für die Färbung der Zellen wurde ein Mastermix erstellt, welcher sich aus 50 µL Perm/Wash-Puffer und 0.5 µL Antikörper (bei Färbung extrazellulärer Proteine) bzw. 1.0 µL Antikörper (bei Färbung intrazellulärer Proteine) pro Sample zusammensetzt. Für die spätere Auswertung wurden Kontrollen angefertigt. Die

FMO-Kontrollen enthalten alle in der Färbung enthaltenen Antikörper mit Ausnahme eines Antikörpers. Dies ermöglicht bei der Auswertung das Setzen entsprechender Gates und damit die Unterscheidung positiver (fluoreszenzmarkierter) von negativen (nicht-fluoreszenzmarkierter) Zellpopulationen und Proteinen. Des Weiteren wurde für jeden einzelnen in der Färbung enthaltenen Antikörper eine Einzelfärbung als Gegenkontrolle zu den FMO-Kontrollen erstellt. Hierbei wurde ein Pool aus den Zellen einiger Wells hergestellt und davon je 100 µL pro Kontrolle auf die 96-Wellplatte übertragen. Pro Kontrolle wurden 50 µL PBS/FCS (1%) und die dazugehörigen Antikörper in entsprechendem Volumen zusammenpipettiert. Anschließend wurden pro Probe 50 µL des Mastermixes bzw. des Kontrollmixes pipettiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 400 x *g* für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet in 100 µL PBS/FCS (1%) resuspendiert und in FACS-Röhrchen übertragen.

Für die Kompensation wurden 100 µL PBS/FCS (1%), 1 Tropfen UltraCompensation Beads und 0.1 µL des jeweiligen Antikörpers zusammengefügt, 10 min bei RT inkubiert, bei 400 x *g* 5 min lang zentrifugiert, anschließend das Beadpellet in 100 µL PBS/FCS (1%) resuspendiert und in FACS-Röhrchen übertragen.

Die anschließend durchgeführte Durchflusszytometrie *(FACS)* dient der Analyse mittels Antikörper fluoreszenzmarkierte Zellen und ermöglicht somit eine quantitative Bestimmung verschiedener Zellpopulationen, intra- und extrazellulärer Proteine, Zytokine und Oberflächenmoleküle.

2.2.6 RNA-Isolation und DNase-Verdau

Um später eine qRT-PCR durchführen zu können, erfolgte davor die RNA-Isolation. Hierbei wurden Gewebestücke des Colons und des Ileums aus C57BL/6 Mäusen chemisch durch die Zugaben von 600 µL RLT/1%β-Mercaptoethanol und mechanisch durch Schütteln bei 20 Hz für 1 min lysiert. Anschließend wurde das RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben verwendet, um RNA zu isolieren. Hierfür wurden die Zelllysate in 600 µL 70% EtOH zugegeben und resuspendiert. EtOH löst noch vorhandene Salze, aber nicht die

RNA selbst auf. Das Gesamtvolumen wurde auf die RNeasy Mini Column pipettiert und für 20 s bei 8000 x *g* zentrifugiert, um EtOH abzuzentrifugieren und das Nukleinsäurepellet zu erhalten. Der Durchlauf wurde verworfen. Auf die RNeasy Mini Column wurden 500 µL RPE-Puffer gegeben, abermals zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Dieser Vorgang wurde wiederholt, aber nun 2 min bei 8000 x *g* zentrifugiert. Anschließend wurde für 1 min bei 14000 x *g* zentrifugiert, um die Säule zu trocknen. Danach wurde 40 µL nucleasefreies Wasser auf die RNeasy Mini Column gegeben. Nach 1 min Inkubation bei RT erfolgte eine Zentrifugation bei 8000 x *g* für 1 min. Die RNeasy Mini Column wurde verworfen und der Durchlauf für die Quantifizierung am Nanodrop verwendet. Hierbei wurden 1 µL jeder RNA-Probe aufgetragen und bei Lid-Faktor 50 bei einer Wellenlänge von 260 nm die RNA-Konzentration in µg/µL gemessen. Nun folgte der DNase-Verdau der isolierten RNA, um noch vorhandene DNA abzubauen. Hierbei kam das RNase-free DNase Set zum Einsatz. Dafür wurden 5 µg der isolierten RNA verwendet und mit nucleasefreiem Wasser auf 50 µL aufgefüllt. Des Weiteren wurden 5 µL 10x DNase-Puffer, 1 µL rRNasin und 2 µL DNAse hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT erfolgte die Zugabe von 6 µL DNAse Inactivation Cocktail und eine Inkubation von 2 min bei RT. Anschließend wurde bei 10000 rpm für 1 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -80°C eingefroren für die spätere Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR.

2.2.7 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren auf dem Prinzip der PCR sowie zur Quantifizierung der Genexpression. Die nach 2.2.6 isolierte und DNase verdaute RNA wurde nach reverser Transkription in DNA unverdünnt verwendet, um die DNA zu quantifizieren. Zur Quantifizierung ist die Erstellung einer Standardreihe mit bekannter RNA-Konzentration notwendig. Zur Herstellung der Standardreihe mit dem Verdünnungsfaktor 1:2 wurde aus mehreren RNA-Proben jeweils ein geringes Volumen entnommen und als Standard 1 (Verdünnung 1:1) gepoolt. Für Standard 2 (Verdünnung 1:2), Standard 3 (Verdünnung 1:4) und Standard 4 (Verdünnung 1:8) wurden jeweils 5 µL nucleasefreies Wasser vorgelegt und 5 µL der RNA-Lösung aus dem

vorherigen Verdünnungsschritt hinzu pipettiert. Zwischen den Entnahmen aus der Verdünnungsreihe wurden die Standards kurz zentrifugiert.

Nun wurde der für die Amplifikation der Nukleinsäurestränge notwendige Mastermix angesetzt. Pro Ansatz wurden 5 µL des QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix, 0.1 µL des Forward Primers, 0.1 µL des Reverse Primers und 3.7 µL nucleasefreies Wasser verwendet.

In jedes Well einer 96-Wellplatte wurden 1 µL der verdünnten RNA-Probe bzw. 1 µL der Standardverdünnung pipettiert. In jeden angefertigten Mastermix wurden pro Probe nun 0.1 µL QuantiFast RT Mix zugegeben und aus jedem Mastermix 9 µL in jedes Well pipettiert. Die 96-Wellplatte wurde anschließend bei 1000 x *g* für 1 min zentrifugiert und die qRT-PCR mittels LightCyclerR 480 Instrument II durchgeführt.

Zur Berechnung der Effizienz der PCR benötigt man die Standardkurve sowie deren Steigung m gemäß Formel (1).

(1) $E = 10^{-\frac{1}{m}}$

In jeder Runde der PCR geht man davon aus, dass sich die cDNA verdoppelt. Daher würde man eine Effizienz von 2 erwarten. Jedoch spielen hier zusätzliche Faktoren eine Rolle, u.a. wie gut ein Primer bindet. Dieser Abweichung wird Rechnung getragen und somit wird dies durch die Formel (2) entsprechend korrigiert:

(2) $$R = \frac{E_{Testgen}^{(Ct\,(unstimuliert)\,Testgen - Ct\,(stimuliert)\,Testgen)}}{E_{Housekeepinggen}^{(Ct\,(unstimuliert)\,Housekeepinggen - Ct(stimuliert)\,Housekeepinggen)}}$$

m = Steigung

E = Effizienz

R = Ratio (Verhältnis)

Ct = *crossing threshold* (Anzahl der Zyklen)

Testgen = der zu untersuchende Genabschnitt

Housekeepinggen = Referenzgen, das zur Kontrolle genutzt wird

In der Auswertung der qRT-PCR wird das zu untersuchende Gen in Verhältnis gesetzt zu einem Referenzgen, welches in der vorliegenden Dissertationsschrift β-Actin ist. Dieses ist die Kontrolle.

2.2.8 FACS-Auswertung

Zur Auswertung der Ergebnisse der FACS-Messungen wurde die Software *FlowJo* angewendet. Das Setzen der entsprechenden Gates für die untersuchten Zellarten und Proteine erfolgte mithilfe von sogenannten FMO- (*fluorescence minus one*) Kontrollen. Hierbei wurde zunächst mittels *Forward Scatter* (FSC) und *Side Scatter* (SSC) Zelldoubletten, -aggregate und -debris ausgeschlossen, um Einzelzellen zu erhalten. Bei *in vitro* Versuchen wurde anschließend mittels einer Lebend-Tot-Färbung die lebenden Zellen analysiert. Schließlich wurden daraus auf die untersuchenden Ziel-Zellarten und Zielproteine hin untersucht. Die entsprechenden Gating-Strategien sind unten im Rahmen der jeweiligen Versuchsergebnisse exemplarisch dargestellt.

2.2.9 Statistik

Die statistische Auswertung der experimentellen Daten wurde mithilfe der Software GraphPad Prism durchgeführt. Hierbei wurden immer zwei experimentelle Gruppen mit einem ungepaarten t-Test verglichen. Bei einem Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte ein ANOVA-Test. Waren die Daten nicht normalverteilt, erfolgte der Vergleich mittels des Kruskal-Wallis-Tests bzw. Mann-Whitney-Tests. Alle Daten der vorliegenden Arbeit sind als Mittelwerte ± Standardabweichung aufgezeichnet. Die Angabe der statistischen Signifikanz erfolgt über p-Werte: *$p < 0,05$; **$p < 0,05$; ***$p < 0,005$; ****$p < 0,0005$.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des Proteinlevels von MCPIP1 und IκBζ nach *in vitro* Stimulation von WT-BMDCs mit *B. vulgatus* und *E. coli*

Da, wie eingangs erwähnt, auf mRNA-Ebene bereits in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, dass *E. coli* zu einer erhöhten Produktion von IκBζ in dendritischen Zellen führt, während jene bei *B. vulgatus* schwächer ausgeprägt ist, wollten wir diese Erkenntnis auf Proteinebene überprüfen. Um die Proteinlevel von IκBζ und MCPIP1 in BMDCs in Abhängigkeit von den Darmkommensalen *E. coli* und *B. vulgatus* zu untersuchen, wurden Wildtyp (WT)-BMDCs für 2 h, 4 h und 16 h mit PBS, *B. vulgatus* bzw. *B. vulgatus*-LPS oder *E. coli* bzw. *E. coli*-LPS stimuliert. Um die Abhängigkeit von TLR-Signalwegen zu analysieren, wurde bei der 4 h-Stimulation zudem noch TAK242, ein TLR4-Inhibitor, verwendet. Die Proteinlevel von IκBζ und MCPIP1 wurden anschließend mittels FACS ermittelt. Hierbei wurden anschließend bei der Auswertung verschiedene Gates gesetzt: zuerst wurde die Zellpopulation markiert und daraus die einzelnen Zellen analysiert. Daraus wiederum wurde aufgeteilt zwischen toten und lebenden Zellen. Tote Zellen exprimieren andere Rezeptoren und Proteine als lebende Zellen. Für das Experiment ist die Expression an lebenden Zellen relevant, da es um die IκBζ- bzw. MCPIP1-Proteinlevel in lebenden dendritischen Zellen geht. Daher wurden die lebenden Zellen verwendet. Daraus wurden die $CD11c^+$ Zellen analysiert, ein Marker für dendritische Zellen, da die Proteinlevel in dendritischen Zellen gemessen werden sollte. Darauf wiederum wurde das Gate für die Zellen gesetzt, welche IκBζ bzw. MCPIP1 exprimieren (s. Abbildung 3 und 4).

Das IκBζ-Proteinlevel war zu jedem Stimulationszeitpunkt bei Stimulation mit *E. coli* oder *E. coli*-LPS signifikant höher als bei Stimulation mit *B. vulgatus* oder *B. vulgatus*-LPS, siehe Abb. 5A. Zudem wurde eine Kinetik sichtbar: das IκBζ-Proteinlevel war bei Stimulation mit *E. coli* oder *E. coli*-LPS nach 2 h und 4 h jeweils vergleichbar hoch, nach 16h deutlich niedriger als nach 2 h und 4 h,

jedoch nicht signifikant. Bei Stimulation mit *B. vulgatus* oder *B. vulgatus*-LPS zeigten sich bezüglich der IκBζ-Expression kaum Schwankungen im Zeitverlauf. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe verhielt sich das IκBζ -Proteinlevel bei Stimulation mit *B. vulgatus* und B. vulgatus-LPS auf gleichem Niveau. Zwischen der Stimulation mit *B. vulgatus* und *B. vulgatus*-LPS zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der IκBζ-Expression.

Nach 4 h Stimulation mit *E. coli*-LPS plus Inhibition mit dem TLR4-Inhibitor TAK242 zeigte sich eine signifikante Reduktion des IκBζ-Proteinlevels. Bei 4 h Stimulation mit *E. coli* plus Inhibition mit TAK242 und bei Stimulation mit *B. vulgatus*-LPS plus Inhibition mit TAK242 zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion des IκBζ-Proteinlevels. Bei Stimulation mit *B. vulgatus* mit Inhibition durch TAK242 war die IκBζ-Expression im Vergleich zur Stimulation ohne Inhibition mit TAK242 unverändert.

Das MCPIP1-Proteinlevel zeigte sowohl bezüglich der Kinetik als auch zwischen den Stimulantien keine statistisch signifikanten Unterschiede, siehe Abb. 5B. Jedoch zeigte sich hier teilweise eine hohe Standardabweichung, sodass die Ergebnisse hierbei mit Vorsicht zu behandeln sind. Nach 2 h verhielt sich das MCPIP1-Proteinlevel bei Stimulation mit *B. vulgatus*-LPS, *E. coli* und *E. coli*-LPS auf gleichem niedrigem Niveau wie jenes der unstimulierten Kontrolle. Die Stimulation mit *B. vulgatus* zeigte im Vergleich dazu eine höhere MCPIP1-Expression, jedoch war diese nicht signifikant. Nach 4 h sowie nach 16 h Stimulation zeigten sich bezüglich des MCPIP1-Proteinlevels keine signifikanten Unterschiede sowohl innerhalb der Gruppen als auch im Vergleich zur Stimulation nach 2 h. Bei Zugabe des TLR4-Inhibitors TAK242 nach 4 h bei Stimulation mit *B. vulgatus*-LPS und *E. coli*-LPS wurde eine Reduktion des MCPIP1-Proteinlevels deutlich, welche jedoch nicht statistisch signifikant war. In den anderen Gruppen zeigte sich bezüglich des MCPIP1-Proteinlevels bei Inhibition mit TAK242 keine Unterschiede.

Die Ergebnisse zeigen, dass E. coli immunogener ist als *B. vulgatus* und TLR4 eine wichtige Rolle spielt bei der Induktion von IκBζ. Wird TLR4 durch TAK242 inhibiert, so fällt das IκBζ-Proteinlevel ab.

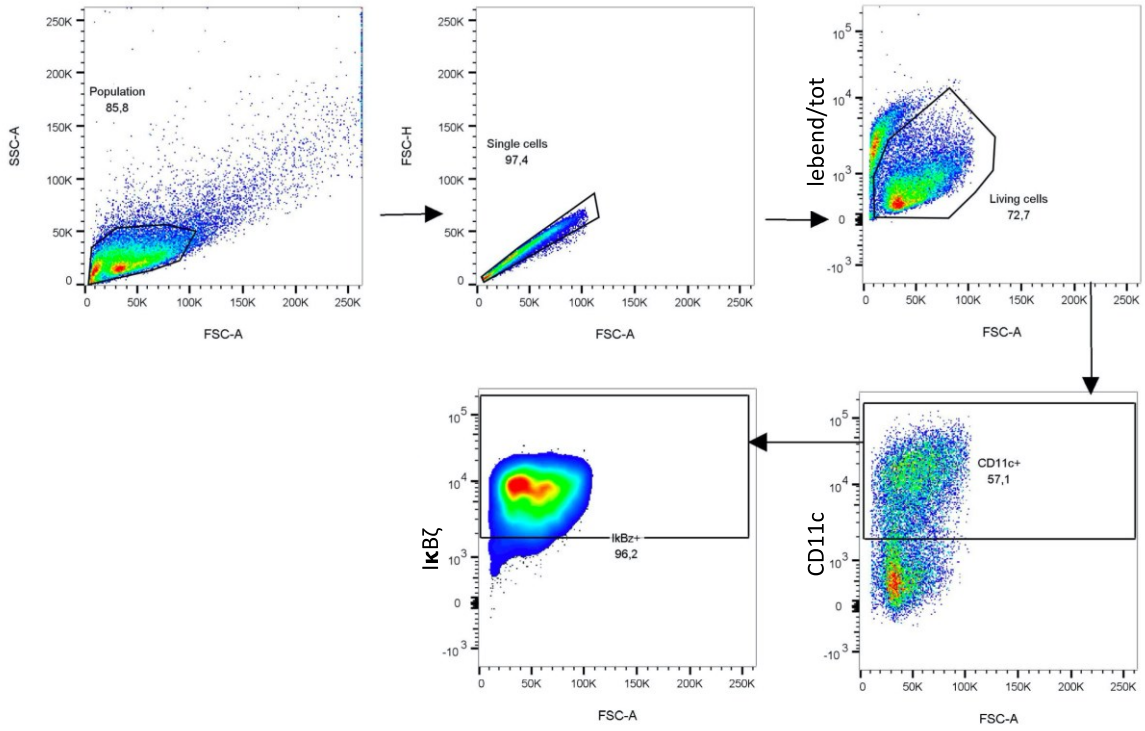

Abbildung 3 Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie der FACS-Auswertung für das IκBζ-Proteinlevel in BMDCs (CD11c⁺).

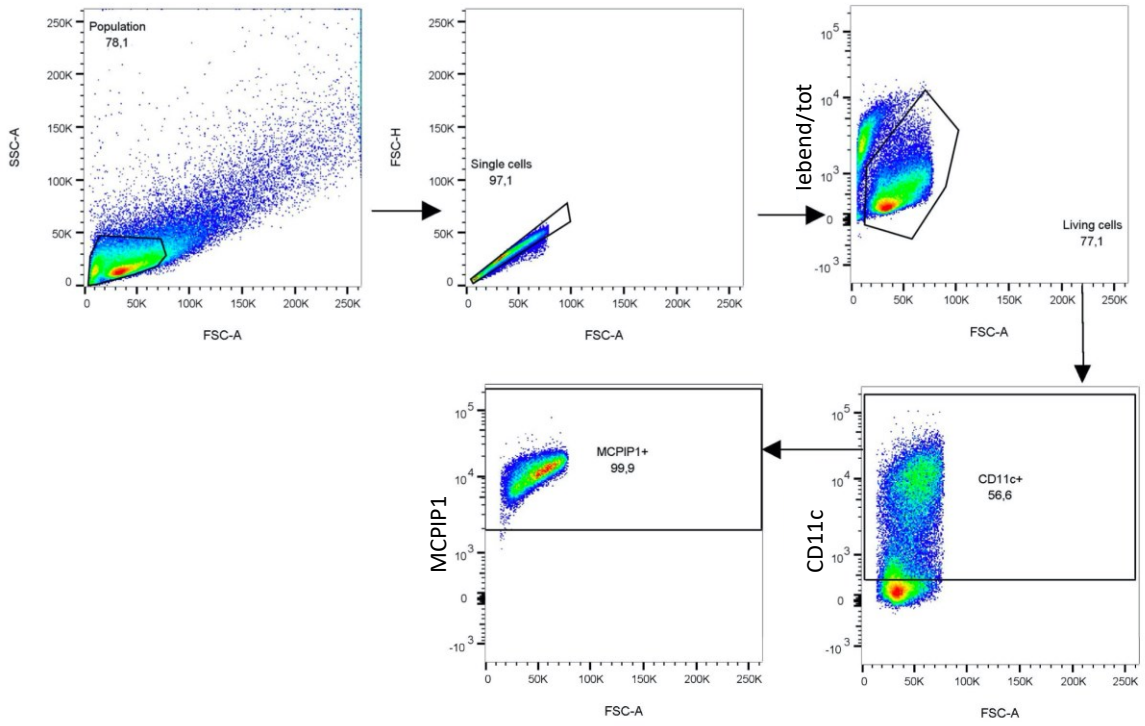

Abbildung 4 Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie der FACS-Auswertung für das MCPIP1-Proteinlevel in BMDCs (CD11c⁺).

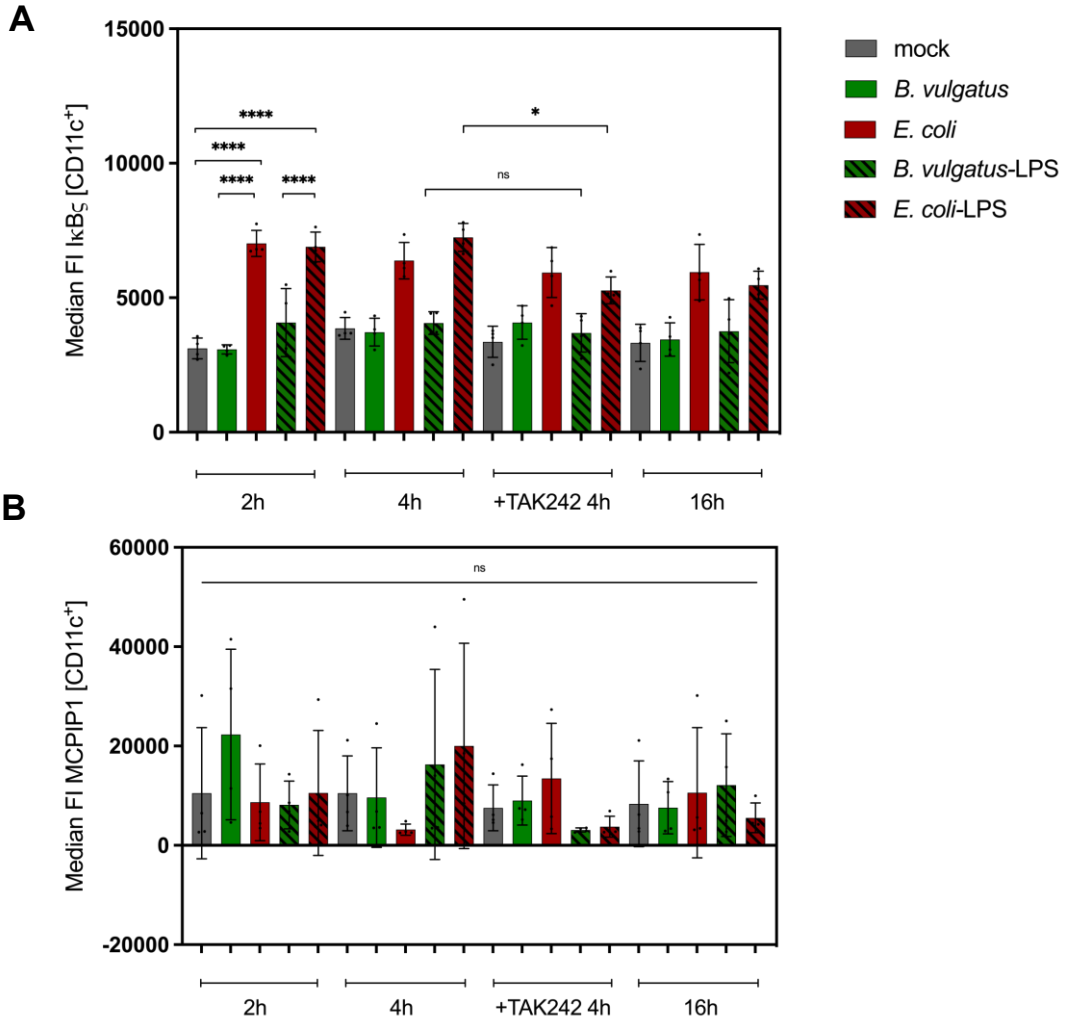

Abbildung 5 (A) IκBζ-Proteinlevel und (B) MCPIP1-Proteinlevel in CD11c$^+$ BMDCs nach Stimulation mit mock, *B. vulgatus*, *B. vulgatus*-LPS, *E. coli* und *E. coli*-LPS für 2h, 4h und 16h mit einer MOI von 1 bzw. einer Konzentration von 5 x 10^8 Bakterien und einer LPS-Konzentration von 100 ng/mL, sowie nach 4h plus TLR4-Inhibition mit 10µM TAK242. Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichung. ns= nicht signifikant, *p<0.05, ****p<0.00005. (**A** modifiziert nach Michaelis et al. 2020, Fig. 2B und Fig. 3E).

3.2 Analyse der T-Zellpolarisation und des Proteinlevels von MCPIP1 und IκBζ in dendritischen Zellen nach Monokolonisierung gnotobiotischer WT-Mäuse mit *B. vulgatus* und *E. coli*

Wie in 3.1 gezeigt, führt die Stimulation mit *E. coli* bzw. *E. coli*-LPS zu einem erhöhten IκBζ-Proteinlevel in CD11$^+$ dendritischen Zellen im Vergleich zur Stimulation mit *B. vulgatus*, *B. vulgatus*-LPS bzw. unstimulierten CD11$^+$

dendritischen Zellen. Zudem zeigte sich eine Reduktion des IκBζ-Proteinlevels nach Inhibition von TLR4. Die *in vitro* gezeigten Ergebnisse führten nun zu der Frage, ob sich diese auch *in vivo* reproduzieren lassen.

Dazu wurden gnotobiotische WT-Mäuse mit *B. vulgatus* bzw. *E. coli* via Trinkwasser monokolonisiert. Mittels FACS wurden das Proteinlevel von MCPIP1 und IκBζ in dendritischen Zellen sowie die T-Zellpolarisation bezüglich TH17-Zellen, TH1-like TH17-Zellen, TH1-Zellen, TH2-Zellen sowie Tregs in Lamina propria aus Kolon, Dünndarm sowie in mesenterialen Lymphknoten bestimmt. Bei der Auswertung wurden mithilfe des Programms FlowJo zunächst die Zellpopulation und folglich die einzeln vorliegenden Zellen ermittelt. Bei der Auswertung des Proteinlevels von MCPIP1 und IκBζ wurden daraus die Zellen ermittelt, welche nicht CD45R, LY6C/G sowie CD64 exprimieren, sowie daraus wiederum die Zellen, welche $CD45^+$ und $CD11c^+$ sind, da man nur $CD11c^+$ dendritische Zellen am Ende ermitteln möchte. Daraus wiederum wurden wieder die IκBζ- sowie die MCPIP-Expression bestimmt, siehe Abb. 6.

Zur Ermittlung der T-Zellpolarisation wurde zunächst nach oben genanntem Schema vorgegangen, danach jedoch die $CD4^+$ Zellen bestimmt, da CD4 ein Oberflächenmolekül ist, welches von T-Zellen exprimiert wird. Daraus wiederum wurden bei der ersten T-Zellfärbung die Zellen ermittelt, welche RORγt exprimieren, den Transkriptionsfaktor für TH17-Zellen. Anschließend konnten dann jene Zellen ermittelt werden, welche IL-10, IFNγ bzw. IL-17A produzieren, siehe Abb. 8. Bei der zweiten T-Zellfärbung wurden jene T-Zellen ermittelt, welche FoxP3 als Transkriptionsfaktor und CD25 auf der Oberfläche exprimieren, die sogenannten Tregs. Anschließend konnte die Produktion von IL-17 und CTLA-4 ermittelt werden, siehe Abb. 10. In der dritten T-Zellfärbung konnten schließlich die TH1-Zellen ($T\text{-}bet^+$ $IFN\gamma^+$) und TH2-Zellen ($GATA\text{-}3^+$ $IL\text{-}4^+$) aus $CD3^+$ Zellen ermittelt werden, siehe Abb. 12.

Zudem wurde mittels qRT-PCR die MCPIP1- und IκBζ-mRNA-Expression im Dünndarmgewebe bestimmt.

Das Proteinlevel von IκBζ in den dendritischen Zellen zeigte im Dünndarm der mit *B. vulgatus* kolonisierten Mäuse eine statistisch signifikante Erhöhung im Vergleich zur keimfreien Kontrollgruppe, siehe Abb. 7B. Abgesehen davon zeigten sich zwischen den Versuchsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede im IκBζ Level in dendritischen Zellen.

Das MCPIP1-Proteinlevel wies in den dendritischen Zellen des Kolons und der mesenterialen Lymphknoten als auch zwischen den Versuchsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede auf. In den dendritischen Zellen des Dünndarms zeigte sich in den mit *B. vulgatus* und *E. coli* kolonisierten Gruppen sowie der keimfreien Gruppe ein signifikant niedrigeres MCPIP1-Proteinlevel im Vergleich zu jenem von Kolon und mesenterialen Lymphknoten, siehe Abb. 7A.

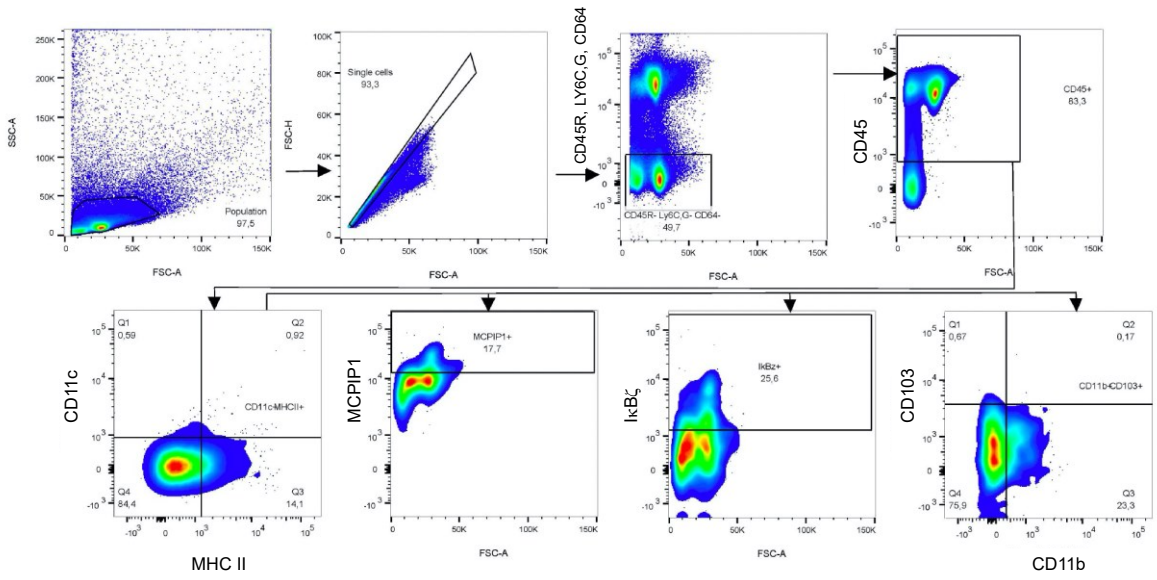

Abbildung 6 Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie der FACS-Auswertung für das IκBζ- und MCPIP1-Proteinlevel in dendritischen Zellen (CD45R$^-$, LY6C/G$^-$, CD64$^-$, CD45$^+$, CD11c$^+$) gnotobiotischer WT-Mäuse.

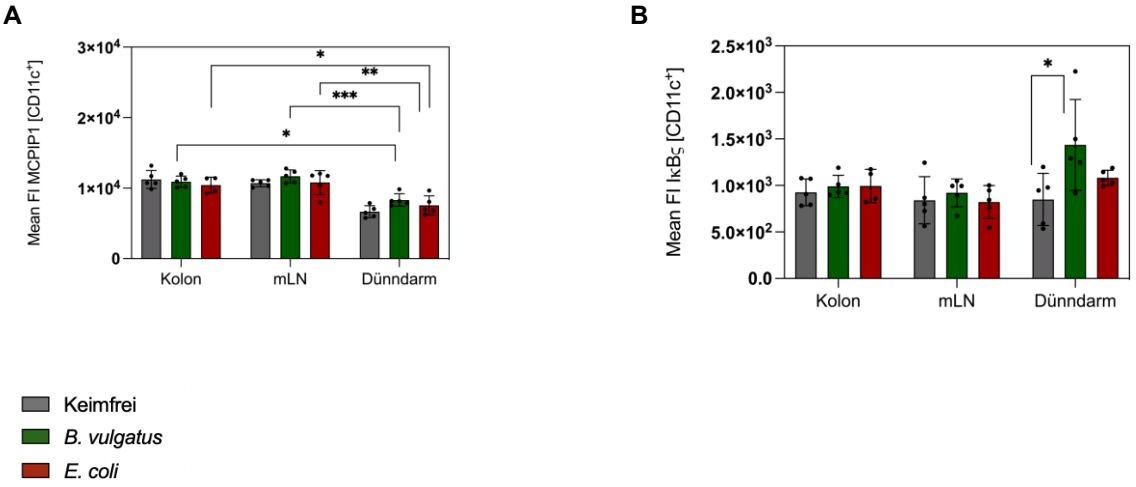

Abbildung 7 (A) MCPIP1-Proteinlevel und (B) IκBζ-Proteinlevel in dendritischen Zellen des Kolons, der mesenterialen Lymphknoten (mLN) und des Dünndarms in gnotobiotischen WT-Mäusen, welche keimfrei gelassen oder via Trinkwasser mit *B. vulgatus* oder *E. coli* monokolonisiert wurden. Die Daten repräsentieren den geometrischen Mean + SD. ns= nicht signifikant, *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005.

Bezüglich der T-Zellpolarisation ergaben sich folgende Ergebnisse: TH17-Zellen (RORγt$^+$), welche IL-17 sezernieren, finden sich ohne signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sowohl in Kolon, mesenterialen Lymphknoten und Dünndarm. In den mesenterialen Lymphknoten war jedoch die absolute Zellzahl der TH17-Zellen, welche IL-17 sezernieren, im Vergleich zu Kolon und Dünndarm generell höher, siehe Abb. 9C.

Th1-like TH17-Zellen, welche auch IFNγ produzieren, fanden sich in allen drei Organsystemen wieder, jedoch nur in sehr geringen absoluten Zellzahlen in Kolon und Dünndarm. In den mesenterialen Lymphknoten war die Zahl der Th1-like TH17-Zellen statistisch signifikant in allen Versuchsgruppen erhöht im Vergleich zu Kolon und Dünndarm, siehe Abb. 9B. In den mesenterialen Lymphknoten ergaben sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede in der absoluten Zellzahl der IFNγ$^+$ TH17-Zellen zwischen den mit *B. vulgatus* und *E. coli* kolonisierten Versuchsgruppen, siehe Abb. 9B. TH17-Zellen, welche neben IL-17 auch IL-10 produzieren, konnten sowohl in Kolon als auch in Dünndarm und mesenterialen Lymphknoten detektiert werden. Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der absoluten Zellzahl sowohl zwischen den Darmabschnitten als auch den einzelnen Versuchsgruppen, siehe Abb. 9A. Eine

nicht-signifikant geringere Anzahl an IL-10^{+} TH17-Zellen konnten in der mit *E. coli* kolonisierten Gruppe in den mesenterialen Lymphknoten sowie im Dünndarm festgestellt werden, siehe Abb. 9A.

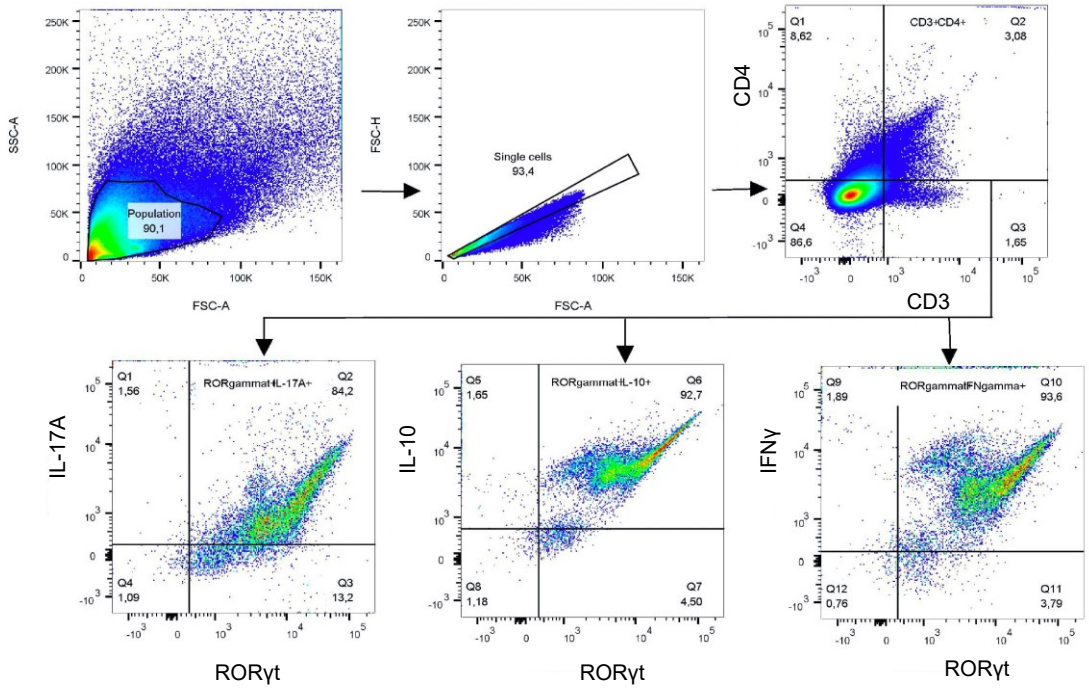

Abbildung 8 Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie der FACS-Auswertung der TH17- und TH1-like TH17-Zellen (RORγt^{+}).

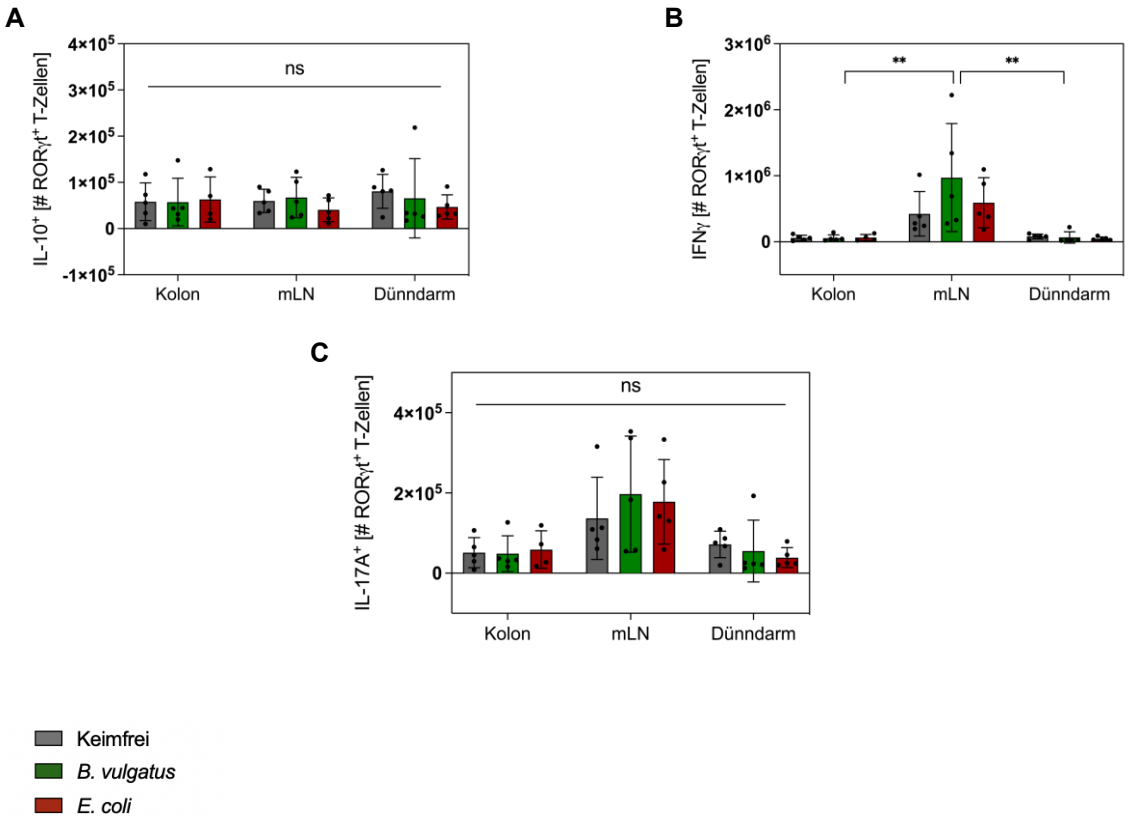

Abbildung 9 Durch FACS bestimmte absolute Anzahl von (A) IL-10⁺ TH17-Zellen, (B) IFNγ⁺ TH1-like TH17 Zellen und (C) generellen IL17⁺ Th17-Zellen in Kolon, mesenterialen Lymphknoten (mLN) und Dünndarm gnotobiotischer WT-Mäuse, welche keimfrei gehalten wurden oder via Trinkwasser mit *B. vulgatus* oder *E. coli* monokolonisiert wurden. Die Daten repräsentieren den geometrischen Mean + SD. ns= nicht signifikant, *p<0.05, **p<0.005.

IL17-produzierende Tregs (CD25⁺ FoxP3⁺ IL17⁺), sogenannte anti-Tregs, ließen sich in allen Versuchsgruppen sowie in Kolon, Dünndarm und mesenterialen Lymphknoten auf einem niedrigen Niveau nachweisen. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich hierbei nicht, siehe Abb. 11A.

CTLA-4, welches eine Herunterregulation der Proliferation und somit eine geringere Stimulation des Immunsystems bewirkt, konnte in allen Versuchsgruppen in Kolon, Dünndarm und mesenterialen Lymphknoten detektiert werden. In den mesenterialen Lymphknoten war die Anzahl an CTLA-4⁺ Tregs in allen drei Versuchsgruppen höher als in Kolon und Dünndarm. Des Weiteren war das Level an CTLA-4⁺ T regs in den mesenterialen Lymphknoten der mit *B. vulgatus* und *E. coli* monokolonisierten Versuchstieren in etwa gleich

hoch, jedoch höher als in der Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede ergaben sich nicht, siehe Abb. 11B.

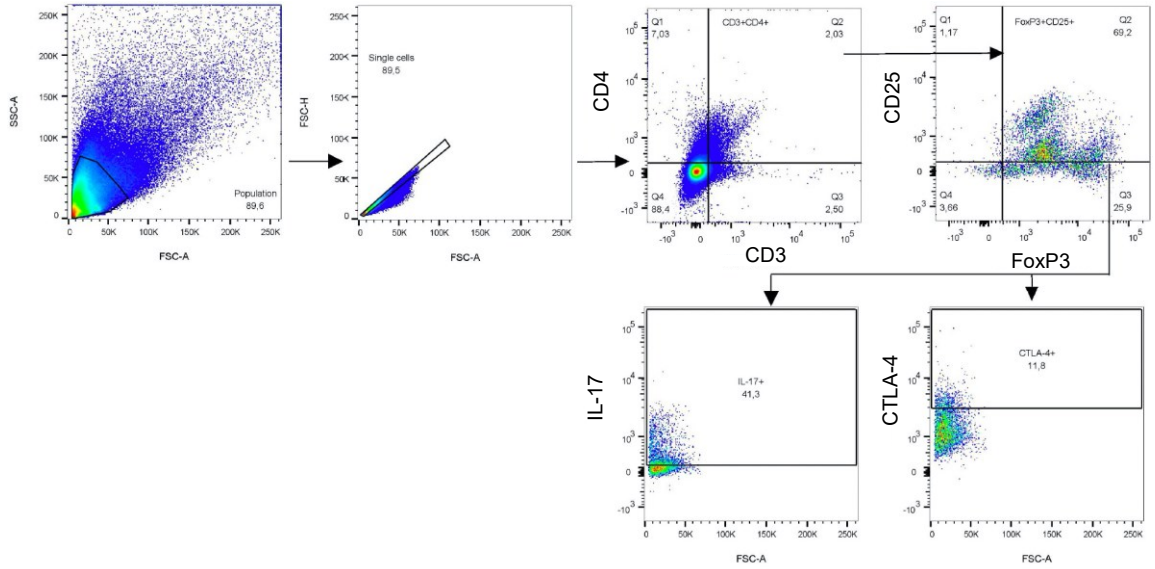

Abbildung 10 Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie der FACS-Auswertung von Tregs ($CD25^+$ $FoxP3^+$) sowie der IL-17- und CTLA-4-Expression.

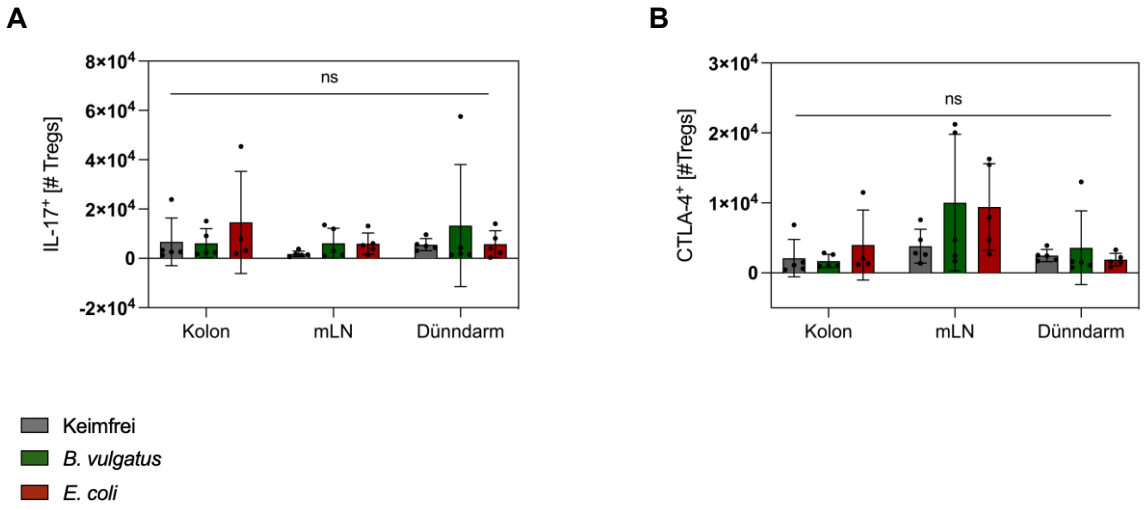

Abbildung 11 Durch FACS bestimmte absolute Anzahl an (A) IL-17^+ und (B) CTLA-4^+ Tregs ($CD25^+$ $FoxP3^+$) in Kolon, mesenterialen Lymphknoten (mLN) und Dünndarm gnotobiotischer WT-Mäuse, welche keimfrei gehalten wurden oder via Trinkwasser mit *B. vulgatus* oder *E. coli* monokolonisiert wurden. Die Daten repräsentieren den geometrischen Mean + SD. ns= nicht signifikant.

TH1-Zellen (T-bet$^+$ IFNγ$^+$) finden sich in geringem Maße in allen Versuchsgruppen in Kolon und Dünndarm wieder und dies in ähnlichen absoluten Zellzahlen. In den mesenterialen Lymphknoten zeigte sich im Vergleich zu Kolon und Dünndarm eine höhere Anzahl an TH1-Zellen. Die Anzahl an TH1-Zellen war in den mesenterialen Lymphknoten der mit *B. vulgatus* kolonisierten Versuchstieren am höchsten und im Vergleich zur keimfreien Kontrollgruppe sowie zu den mit *B. vulgatus* kolonisierten Versuchstieren in Kolon und Dünndarm statistisch signifikant höher, siehe Abb. 13A.

TH2-Zellen (GATA-3$^+$ IL-4$^+$) finden sich in Kolon, Dünndarm und mesenterialen Lymphknoten und allen Versuchsgruppen auf einem ähnlichen niedrigen Niveau wieder. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Darmbestandteilen sowie den einzelnen Versuchsgruppen nachweisen, siehe Abb. 13B.

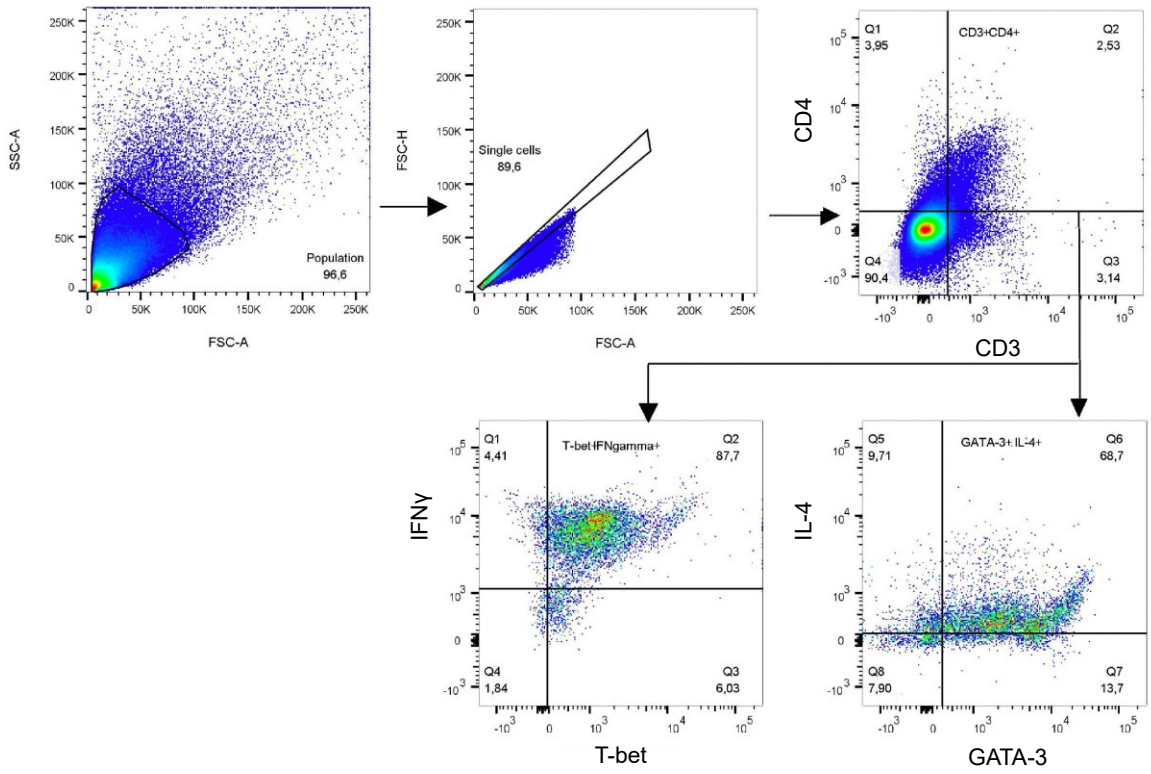

Abbildung 12 Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie der FACS-Auswertung von TH1-Zellen (T-bet$^+$ IFNγ$^+$) und TH2-Zellen (GATA-3$^+$ IL-4$^+$).

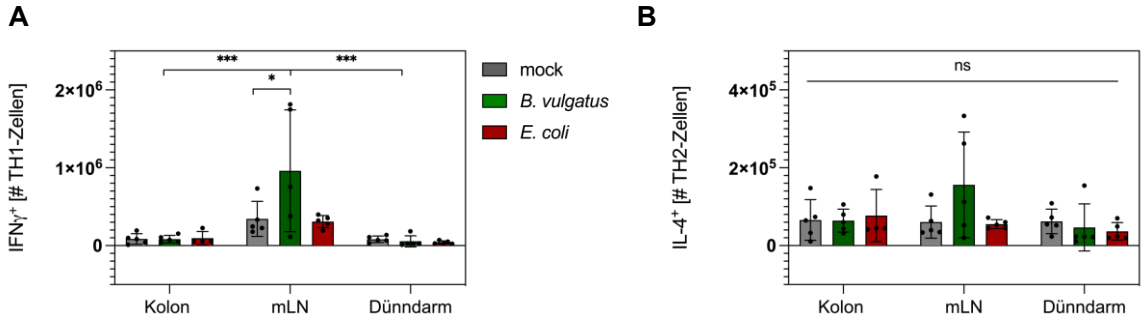

Abbildung 13 (A) Level an TH1-Zellen (T-bet$^+$ IFNγ$^+$) und (B) TH2-Zellen (GATA-3$^+$ IL-4$^+$) in Kolon, mesenterialen Lymphknoten und Dünndarm gnotobiotischer WT-Mäuse, welche via Trinkwasser mit *B. vulgatus* oder *E. coli* monokolonisiert wurden. Die Daten repräsentieren den geometrischen Mean + SD. ns= nicht signifikant, *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005.

Auf mRNA-Ebene konnte die relative CTLA-4-Genexpression mittels qRT-PCR im Dünndarm untersucht werden. Hierbei ergaben sich keine Unterschiede zwischen den mit *E. coli* und den mit *B. vulgatus* monokolonisierten Mäusen, siehe Abb. 14D. Die relative IκBζ- sowie MCPIP1-Genexpression im Dünndarm zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den mit *E. coli* und den mit *B. vulgatus* monokolonisierten Versuchstieren, siehe Abb. 14A und B. Das Verhältnis war in der *B. vulgatus* kolonisierten Versuchsgruppe insignifikant erhöht verglichen mit der *E. coli*-kolonisierten Versuchsgruppe, siehe Abb. 14C.

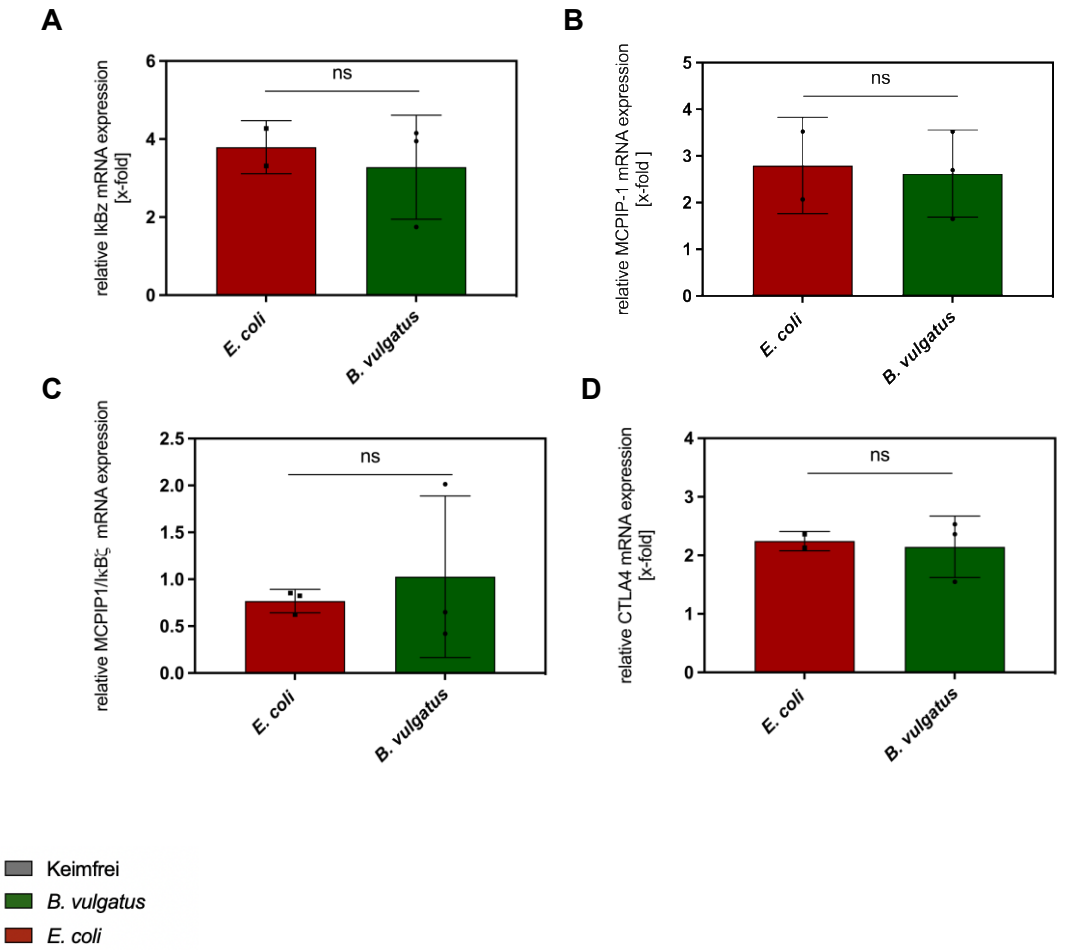

Abbildung 14 Relative (A) IκBζ--Genexpression, (B) MCPIP1-Genexpression und (C) das berechnete Verhältnis dieser Genexpressionen zueinander, sowie die (D) CTLA-4-Genxpression im Dünndarm gnotobiotischer WT-Mäuse, welche via Trinkwasser mit *B. vulgatus* oder *E. coli* monokolonisiert wurden. Die Daten repräsentieren den geometrischen Mean + SD. ns= nicht signifikant.

3.3 Analyse der T-Zellpolarisation und des Proteinlevels von MCPIP1 und IκBζ nach Monokolonisierung mit *B. vulgatus* und *E. coli* und T-Zelltransfer auf gnotobiotische Rag1$^{-/-}$ Mäuse

Aufgrund der geringen Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen in 3.2 bezüglich des Proteinlevels von MCPIP1, IκBζ und bezüglich der T-Zellpolarisation in gnotobiotischen Wildtypmäusen, gingen wir einen Schritt weiter und untersuchten, ob es Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen in gnotobiotischen Rag1$^{-/-}$ Mäusen gibt. Rag1$^{-/-}$ Mäuse besitzen weder T- noch B-Zellen. Da wir vermuteten, dass B-Zellen mit den T-

Zellen interferieren und dadurch die Ergebnisse beeinflussen, schlossen wir die B-Zellen mit diesem Folgeversuch aus.

Gnotobiotische Rag1$^{-/-}$ Mäuse wurden mit *B. vulgatus* bzw. *E. coli* monokolonisiert. Ein Teil der Tiere erhielt zusätzlich zur Monokolonisation naive T-Zellen verabreicht, um später die T-Zellpolarisation in Immunzellpopulationen in Dünndarm, Kolon und mesenterialen Lymphknoten untersuchen zu können. Mittels FACS wurden zum einen die Proteinlevel von MCPIP1 und IκBζ in dendritischen Zellen aus Dünndarm, Kolon und mesenterialen Lymphknoten untersucht, zum anderen in den mit T-Zellen verabreichten Versuchstieren zusätzlich die T-Zellpolarisation analysiert.

Die Auswertung mittels des Programms FlowJo erfolgte nach dem bereits in Kapitel 3.2 erwähnten Schema, siehe Abbildung 15, 17, 19, 21.

Das IκBζ-Proteinlevel zeigte sich in den dendritischen Zellen aus Kolon und Dünndarm durchweg in allen Versuchsgruppen auf demselben niedrigen Niveau. In den mesenterialen Lymphknoten konnte in den mit *E. coli* kolonisierten Versuchstieren (sowohl mit als auch ohne T-Zellen) ein erhöhtes IκBζ-Proteinlevel detektiert werden, welches im Vergleich zu den mit *B. vulgatus* kolonisierten, sowie den unkolonisierten Versuchstieren jedoch keine statistische Signifikanz aufwies. Das IκBζ-Proteinlevel in dendritischen Zellen in den mesenterialen Lymphknoten war signifikant höher als in denen des Kolons der Tiere, welche *E. coli* und T-Zellen erhielten.

Das MCPIP1-Proteinlevel in dendritischen Zellen zeigte sich in Kolon und mesenterialen Lymphknoten sowie durch alle Versuchsgruppen hinweg auf ähnlichen Werten. Im Dünndarm, der mit *E. coli* kolonisierten Tiere ohne T-Zellen war jenes im Vergleich zu Kolon und mesenterialen Lymphknoten leicht erhöht, jedoch nicht statistisch signifikant. Das MCPIP1-Proteinlevel war auch im Dünndarm über alle Versuchsgruppen hinweg nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Jedoch ist hierbei zu erwähnen, dass während des Versuchs Tiere aus den Gruppen der T-Zellen gestorben sind, sodass es weniger Tiere

waren, als in den Gruppen ohne T-Zellen. Daher ist die Statistik an dieser Stelle nur bedingt aussagekräftig.

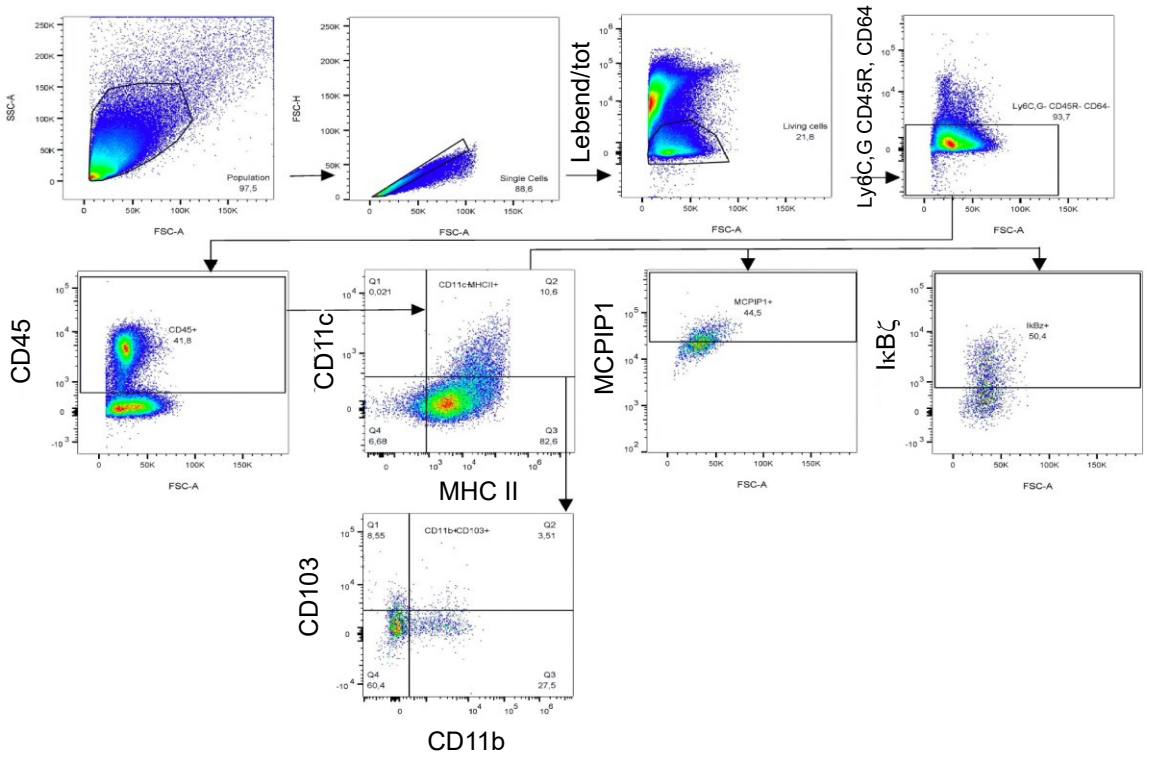

Abbildung 15 Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie für das IκBζ- und MCPIP1-Proteinlevel in dendritischen Zellen (CD11c⁺).

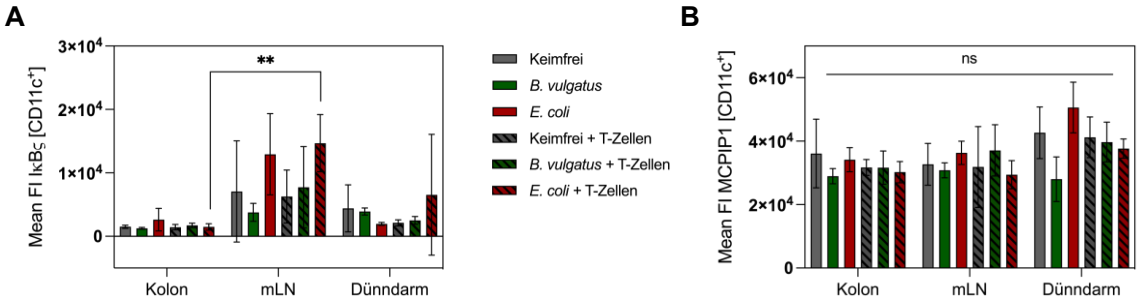

Abbildung 16 (A) IκBζ-Proteinlevel und (B) MCPIP1-Proteinlevel in dendritischen Zellen (CD11c⁺) von Kolon, mesenterialen Lymphknoten (mLN) und Dünndarm gnotobiotischer Rag1$^{-/-}$ Mäuse, welche mit *B. vulgatus* und *E. coli* monokolonisiert wurden und teilweise eine T-Zelltransplantation erhielten. Die Daten repräsentieren den geometrischen Mean + SD. ns= nicht signifikant, **p<0.005.

Um den Einfluss der Kommensalen auf die Polarisierung von T-Zellen zu untersuchen, wurden verschiedene T-Zellgruppen (Tregs, TH17-Zellen, TH1-Zellen, TH2-Zellen) ausgewertet. Bezüglich der Menge an IL-10 und IL-17 produzierenden TH17-Zellen zeigten sich zwischen den Versuchsgruppen als auch zwischen Kolon, mesenterialen Lymphknoten und Dünndarm keine signifikanten Unterschiede, jedoch war die absolute Anzahl an IL-10 produzierenden TH17-Zellen, den sogenannten protektiven TH17-Zellen, in den mesenterialen Lymphknoten im Vergleich zu Kolon und Dünndarm in allen Versuchsgruppen erhöht, siehe Abbildung 18 A.

TH1-like TH17-Zellen fanden sich in geringer Menge in allen Versuchsgruppen in Kolon, Dünndarm und mesenterialen Lymphknoten wieder. Die Menge an TH1-like TH17-Zellen war im Dünndarm in allen Versuchsgruppen generell hoch, jedoch im Vergleich zu Kolon und mesenterialen Lymphknoten nicht signifikant erhöht, siehe Abbildung 18 B.

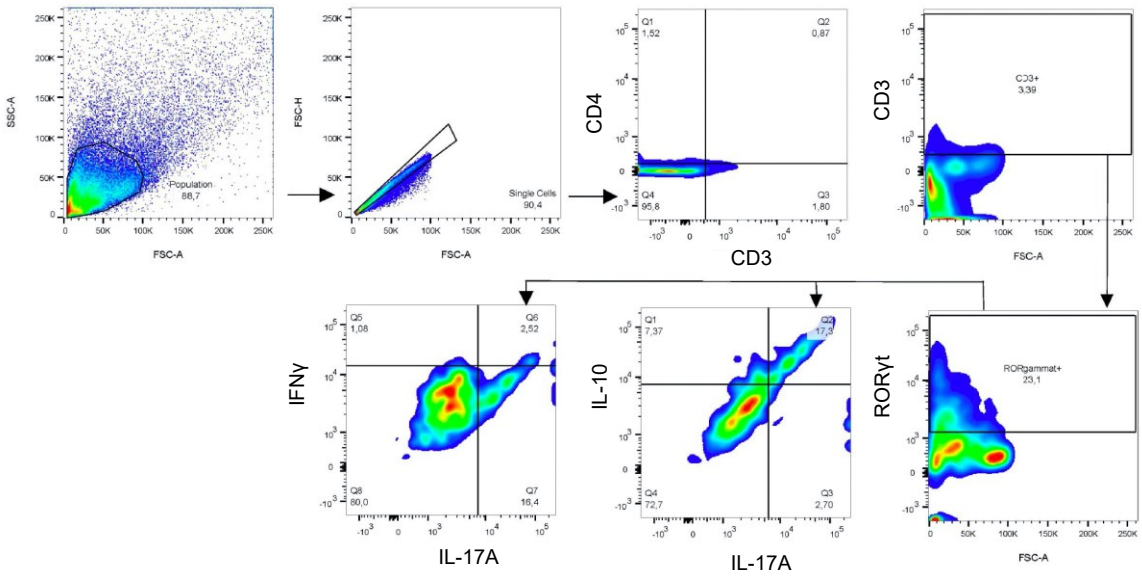

Abbildung 17 Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie für TH17-Zellen ($CD3^+$ $ROR\gamma t^+$) mit Aufspaltung in TH1-like TH17 Zellen ($IL\text{-}17A^+$ $IFN\gamma^+$) und protektive TH17-Zellen ($IL\text{-}17A^+$ $IL\text{-}10^+$).

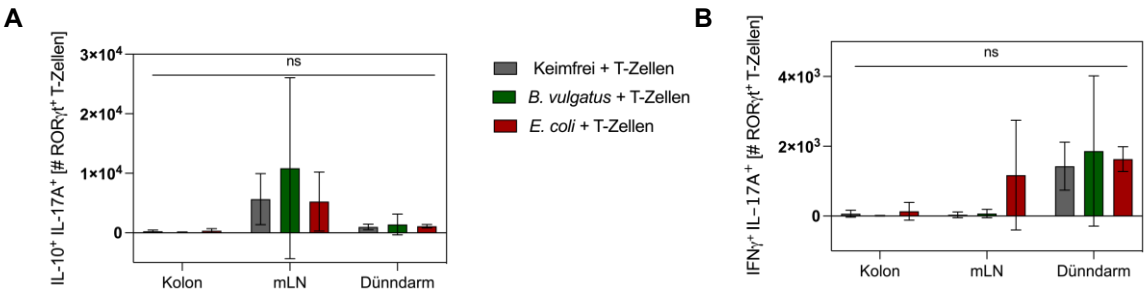

Abbildung 18 Darstellung der absoluten Zellzahlen von (A) IL-10^{+} TH17-Zellen in Kolon, mesenterialen Lymphknoten und Dünndarm sowie an (B) TH1-like TH17-Zellen in Kolon, mesenterialen Lymphknoten und Dünndarm in gnotobiotischen Rag1$^{-/-}$ Mäusen, welche über das Trinkwasser mit *B. vulgatus* und *E. coli* monokolonisiert wurden und eine T-Zelltransplantation erhielten. Die Daten repräsentieren den geometrischen Mean + SD. ns= nicht signifikant.

IL-17^{+} Tregs, die anti-Tregs, fanden sich in allen Versuchsgruppen sowohl in Kolon als auch in Dünndarm und mesenterialen Lymphknoten auf einem gleichen Niveau wieder, siehe Abbildung 19 A. CTLA-4 auf Tregs war in Dünndarm und Kolon in nur sehr geringem Maße nachweisbar. In den mesenterialen Lymphknoten war die absolute Anzahl von CTLA-4 exprimierenden Zellen in allen Versuchsgruppen im Vergleich zu Kolon und Dünndarm signifikant höher. In den mesenterialen Lymphknoten der mit *E. coli* kolonisierten Tieren war die absolute Anzahl von CTLA-4 exprimierenden Zellen im Vergleich zu den mit *B. vulgatus* kolonisierten Tieren und der Kontrollgruppe signifikant höher, siehe Abbildung 19 B.

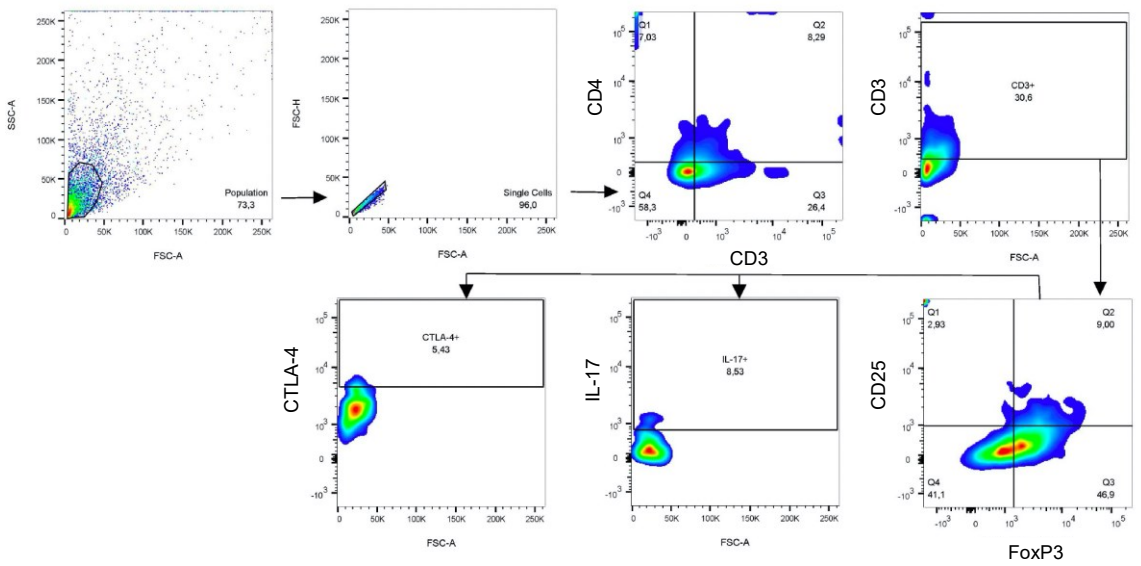

Abbildung 19 Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie der FACS-Auswertung für Tregs ($CD3^+$ $CD25^+$ $FoxP3^+$).

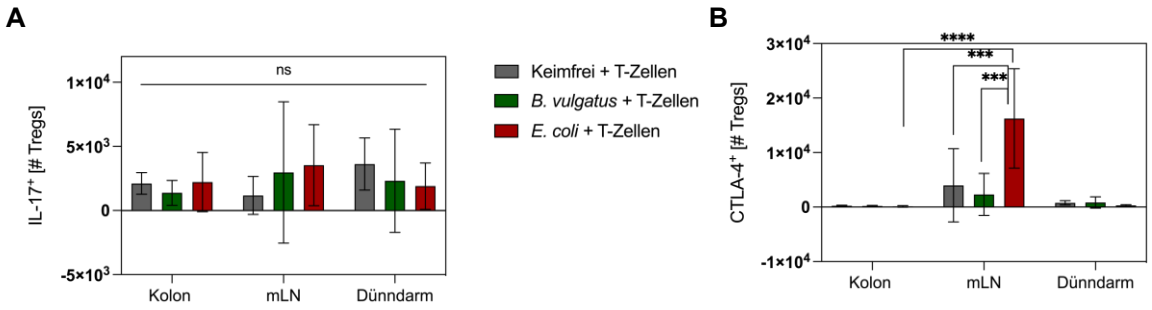

Abbildung 20 Darstellung der Verteilung an IL-17 sezernierenden Tregs ($CD3^+$ $CD25^+$ $FoxP3^+$) sowie der CTLA-4-Expression in Tregs in Kolon, mesenterialen Lymphknoten (mLN) und Dünndarm gnotobiotischer $Rag1^{-/-}$ Mäuse nach Monokolonisierung mit *B. vulgatus* und *E. coli* und T-Zellgabe. Die Daten repräsentieren den geometrischen Mean + SD. ns= nicht signifikant, *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.00005.

TH1-Zellen waren in allen Versuchstieren und allen Darmabschnitten nachweisbar, jedoch in unterschiedlich starken absoluten Anzahlen. Im Kolon aller Versuchsgruppen verhielt sich das Level an TH1-Zellen auf demselben niedrigen Niveau. In den mesenterialen Lymphknoten nahm jenes von der Kontrollgruppe über die mit *B. vulgatus* kolonisierten Mäuse hin zu den mit *E. coli* kolonisierten Mäusen zu, jedoch ohne signifikante Unterschiede. Im Dünndarm

war jenes am höchsten und zwischen den Versuchsgruppen auf vergleichbar ähnlichen Werten ausgeprägt.

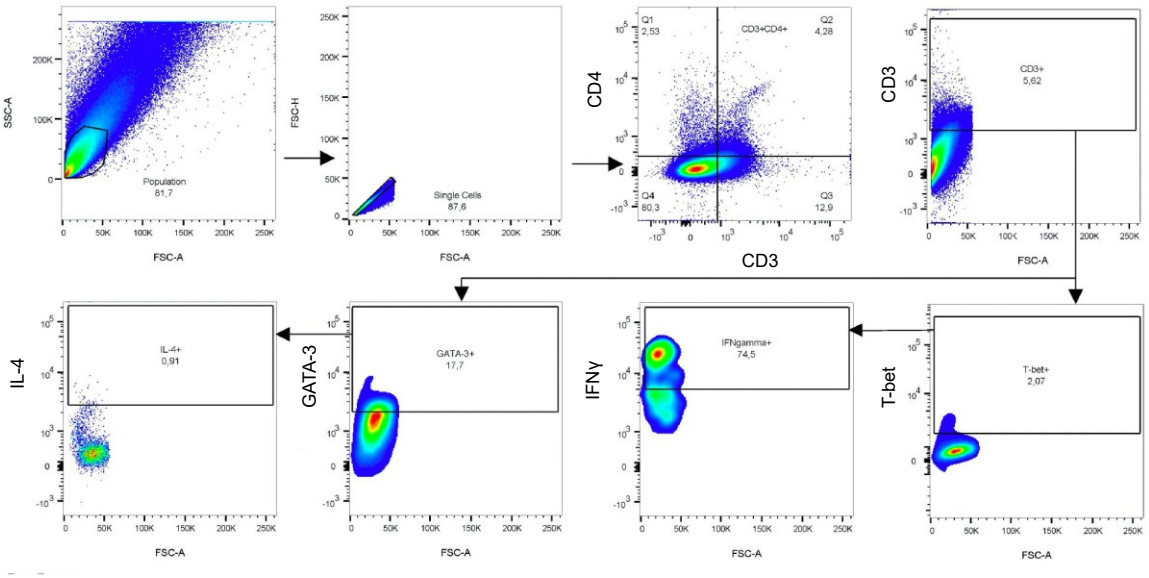

Abbildung 21 Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie von TH1-Zellen (T-bet$^+$ IFNγ$^+$) und TH2-Zellen (GATA-3$^+$ IL-4$^+$).

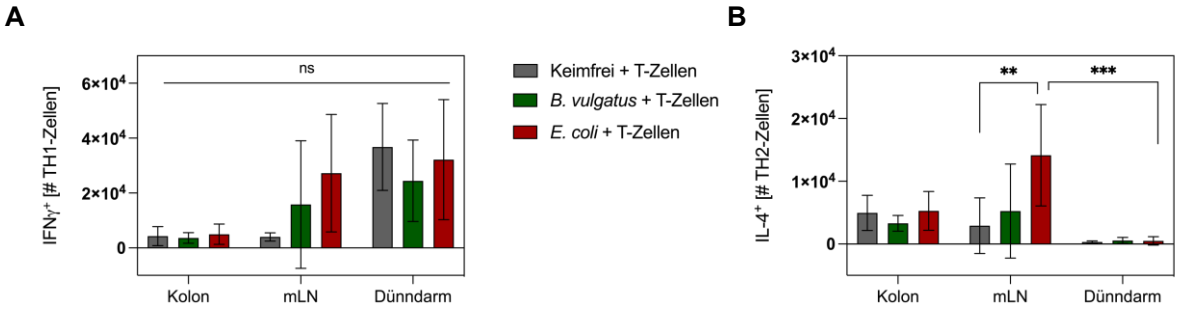

Abbildung 22 Darstellung der absoluten Anzahl von (A) TH1-Zellen und (B) TH2-Zellen in Kolon, mesenterialen Lymphknoten und Dünndarm gnotobiotischer Rag1$^{-/-}$ Mäuse, welche mit *B. vulgatus* und *E. coli* monokolonsiert wurden und eine T-Zelltransplantation erhielten. Die Daten repräsentieren den geometrischen Mean + SD. ns= nicht signifikant, *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005.

3.4 Analyse der T-Zellpolarisation und -proliferation nach *in vitro* Stimulation einer Cokultur von WT-BMDCs und OT-II-T-Zellen mit *B. vulgatus* und *E. coli*

Wildtyp (WT)-BMDCs wurden mit *B. vulgatus* bzw. *E. coli* stimuliert und anschließend in einer Cokultur gemeinsam mit OT-II-T-Zellen kultiviert, um den Einfluss der Kommensale *in vitro* auf die Proliferation und Polarisation der T-Zellen sowie das MCPIP1- und IκBζ-Proteinlevel in knochenmarksgereiften dendritischen Zellen (BMDCs) zu untersuchen.

Das IκBζ-Proteinlevel zeigte sich in der Cokultur von BMDCs, OT-II-T-Zellen und Ova-Peptid sowie in der Cokultur von BMDCs und OT-II-T-Zellen auf niedrigem und ähnlichem Niveau, siehe Abbildung 23 B. Die Unterschiede zwischen den unstimulierten, mit *B. vulgatus* bzw. mit *E. coli* stimulierten Zellen waren kaum vorhanden und statistisch nicht signifikant. In der Einzelkultur der BMDCs zeigte sich ein höheres IκBζ-Proteinlevel der mit *B. vulgatus* und *E. coli* stimulierten BMDCs im Vergleich zu den unstimulierten BMDCs. Das IκBζ-Proteinlevel der mit *E. coli* stimulierten BMDCs war auch höher als jenes, der mit *B. vulgatus* stimulierten BMDCs. Diese Unterschiede waren jeweils jedoch nicht signifikant. Ähnlich verhielt es sich in Einzelkultur von BMDCs, zu der Ova-Peptid pipettiert wurde. Im Vergleich der kompletten Cokultur von BMDCs, T-Zellen und Ova-Peptid zur BMDCs-Einzelkultur zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich des IκBζ-Proteinlevels der mit *E. coli* und *B. vulgatus* stimulierten Zellen. Das IκBζ-Proteinlevel in BMDCs war in der Cokultur sowohl in den unstimulierten als auch in *E. coli* bzw. *B. vulgatus* stimulierten BMDCs signifikant geringer als in der BMDCs-EInzelkultur. Innerhalb der Cokultur zeigten sich dann keine signifikanten Unterschiede des IκBζ-Proteinlevels zwischen unstimulierter und mit *E. coli* bzw. *B. vulgatus* stimulierten BMDCs.

Das MCPIP1-Proteinlevel in der BMDC-Einzelkultur sowie der Einzelkultur von BMDCs und Ova-Peptid zeigte eine leichte Erhöhung in den mit *B. vulgatus* stimulierten Zellen im Vergleich zu mock und *E. coli* stimulierten Zellen. Auch hier waren die MCPIP1-Proteinlevel zwischen den beiden Konditionen auf

vergleichbar hohem Niveau, siehe Abbildung 23 A. Die MCPIP1-Proteinlevel der Cokultur mit BMDCs, T-Zellen und Ova-Peptid sowie BMDCs und T-Zellen waren auf niedrigem Niveau mit kaum erkennbaren Unterschieden zwischen den verschiedenen Stimulantien. Das MCPIP-1 Proteinlevel in mit *E. coli* stimulierten BMDCs waren signifikant erhöht im Vergleich zu den ebenso mit *E. coli* stimulierten BMDCs, T-Zellen + Ova-Peptid. Genauso verhielt es sich bei den mit *B. vulgatus* stimulierten BMDCs im Vergleich zu den ebenso mit *B. vulgatus* stimulierten BMDCs, T-Zellen + Ova-Peptid.

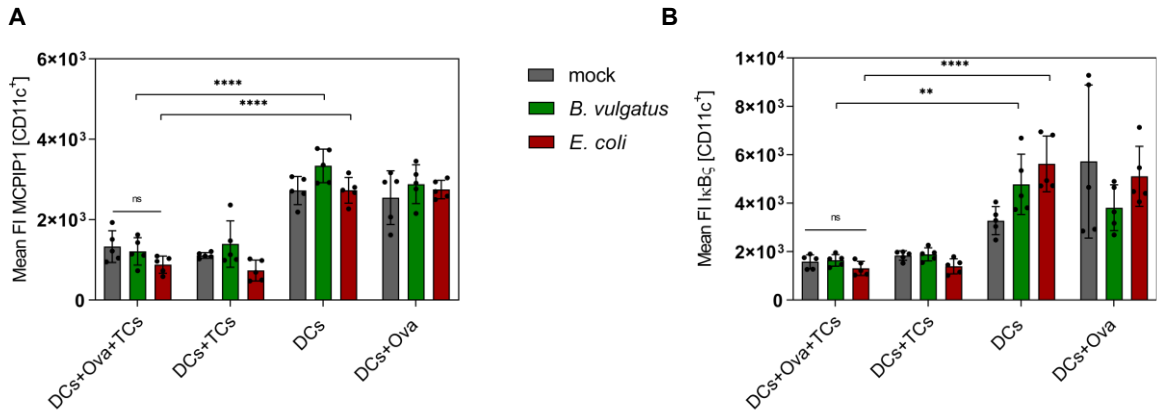

Abbildung 23 (A) MCPIP1-Proteinlevel und (B) IκBζ-Proteinlevel in einer Cokultur von BMDCS, welche mit B. vulgatus bzw. E. coli stimuliert wurden, mit OT-II-T-Zellen. Die Daten repräsentieren den geometrischen Mean + SD. ns= nicht signifikant, *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.00005

Bezüglich der T-Zellpolarisation und -proliferation ergaben sich folgende Ergebnisse:

Bezüglich der T-Zellproliferation der Th1-like TH17-Zellen ($CD4^+$ Ova-TCR^+ $ROR\gamma t^+$ $IFN\gamma^+$) ließ sich anhand Abb. 24 A zeigen, dass in einer Cokultur von BMDCs mit OT-II-T-Zellen neue Tochtergenerationen ausgebildet werden, wenn die dendritischen Zellen mit *E. coli* bzw. *B. vulgatus* stimuliert wurden. Es wurden auch in Cokulturen mit unstimulierten BMDCs neue Tochtergenerationen gebildet, jedoch nicht in demselben Maße.

Wird kein Ova-Peptid hinzugegeben, so findet keine T-Zellproliferation statt (Abb. 24 B). OT-II-T-Zellen können nur über ihren Ova-spezifischen T-Zellrezeptor über Ova-Peptid, welches von den dendritischen Zellen über ihr MHC II präsentiert

wird, aktiviert werden. Fehlt Ova-Peptid, können auch keine Differenzierung und Proliferation auf Stimulantien hin stattfinden.

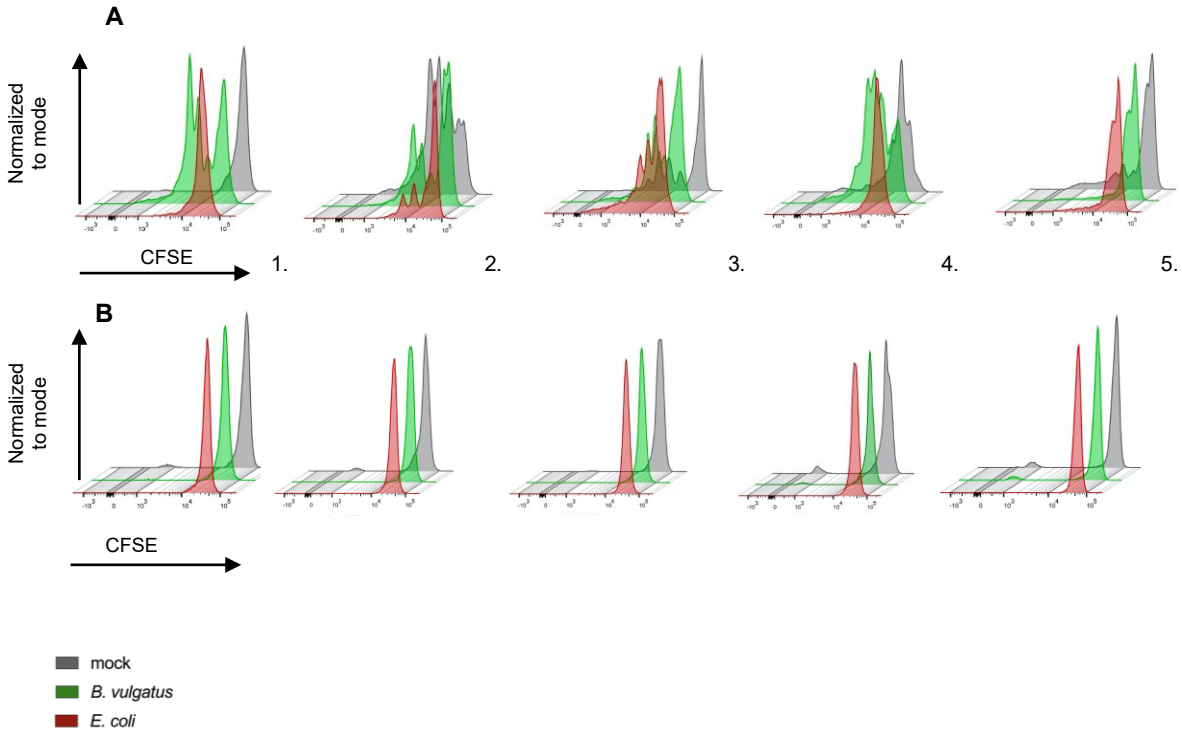

Abbildung 24 Proliferation der CD4⁺ Ova-TCR⁺ RORγt⁺ IFNγ⁺ T-Zellen, gewonnen aus 5 verschiedenen Mäusen (Diagramm 1.-5.), sichtbar gemacht durch CFSE. Jeder Peak markiert eine neue Zellgeneration. (A) Cokultur von BMDCS mit OT-II-T-Zellen und Zugabe von Ova-Peptid und Stimulation mit mock (grau), *B. vulgatus* (grün) und *E. coli* (rot). (B) Cokultur von BMDCS mit OT-II-T-Zellen ohne Zugabe von Ova-Peptid und Stimulation mit mock (grau), *B. vulgatus* (grün) und *E. coli* (rot).

Bezüglich der T-Zellpolarisation wurden TH17-Zellen sowie Tregs untersucht. Die IFNγ-Produktion der TH17-Zellen war in allen Versuchsgruppen gleich. Es ergaben sich keine Unterschiede daraus, ob die T-zellaktivierenden dendritischen Zellen mit *B. vulgatus* oder *E. coli* oder mock stimuliert wurden.

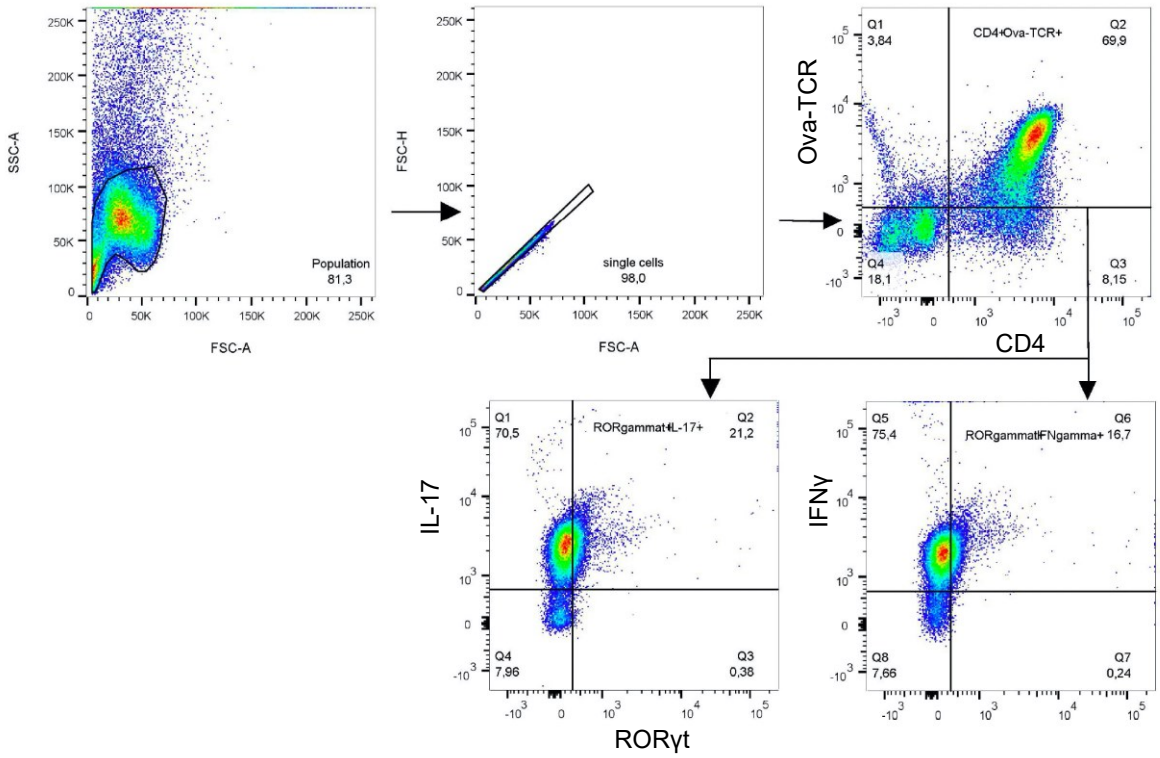

Abbildung 25 Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie der FACS-Auswertung von TH17-Zellen ($CD4^+$ $Ova\text{-}TCR^+$ $ROR\gamma t^+$).

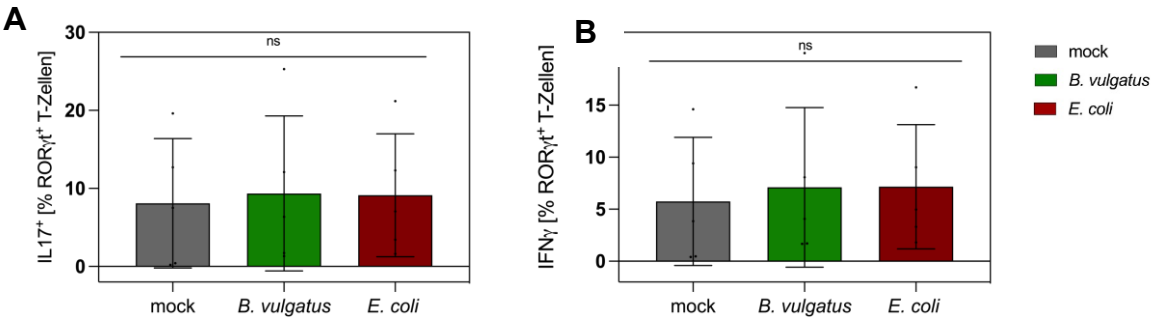

Abbildung 26 (A) IL-17-Expression und (B) IFNγ-Expression von TH17-Zellen ($CD4^+$ $Ova\text{-}TCR^+$ $ROR\gamma t^+$) in einer Cokultur mit BMDCs nach Stimulation mit *B. vulgatus* bzw. *E. coli*. Die Daten repräsentieren den geometrischen Mean + SD. ns= nicht signifikant.

$IL\text{-}17^+$ Tregs wurden in allen Versuchsreihen in gleichem Maße gebildet und dies unabhängig davon, ob die T-zellaktivierenden dendritischen Zellen mit mock, *E. coli* oder *B. vulgatus* stimuliert wurden. Statistisch signifikante Unterschiede konnten nicht ermittelt werden, siehe Abbildung 28.

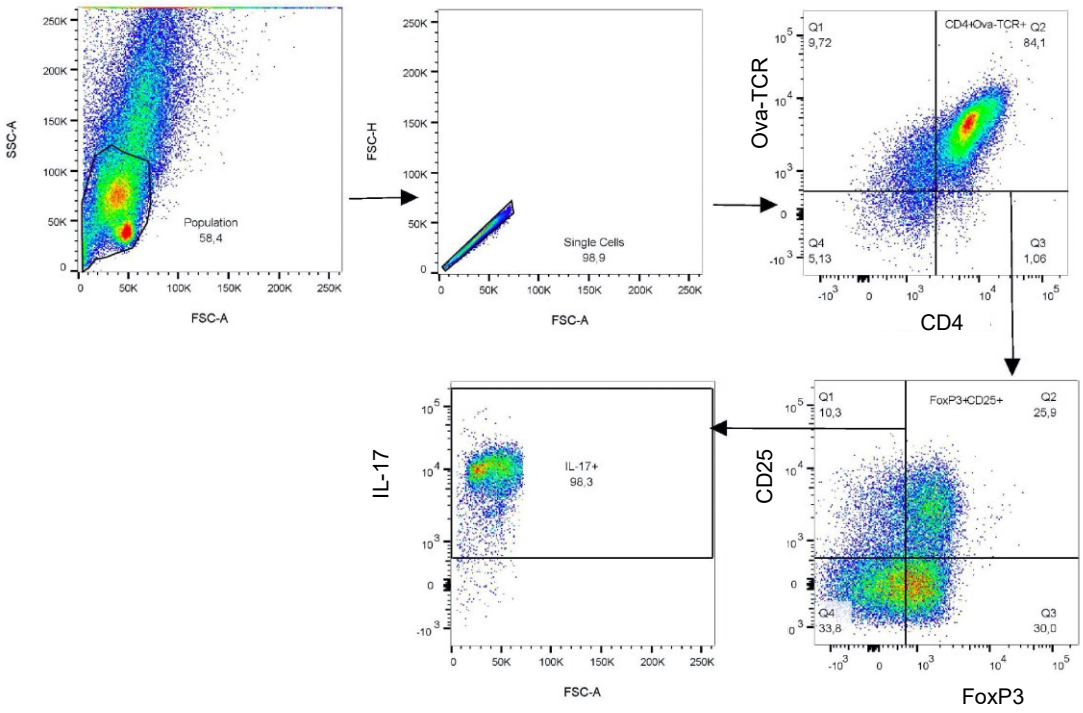

Abbildung 27 Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie der FACS-Auswertung der IL-17-Expression der Tregs ($CD4^+$ $Ova\text{-}TCR^+$ $FoxP3^+$).

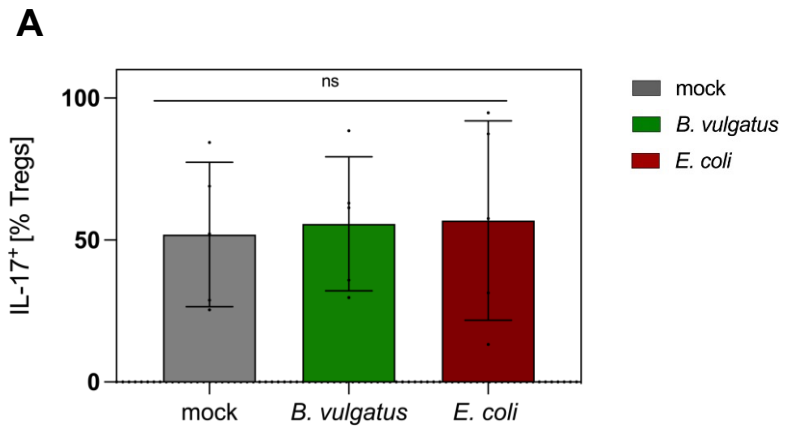

Abbildung 28 Tregs ($CD4^+$ $Ova\text{-}TCR^+$ $FoxP3^+$) in einer Cokultur mit BMDCs nach Stimulation mit *B. vulgatus* bzw. *E. coli.* Die Daten repräsentieren den geometrischen Mean + SD. ns= nicht signifikant.

Bezüglich der T-Zellproliferation der Tregs ($CD4^+$ $Ova\text{-}TCR^+$ $CD25^+$ $FoxP3^+$) ließ sich anhand der Ergebnisse aus Abb. 29 A zeigen, dass in einer Cokultur von BMDCs mit OT-II-T-Zellen neue Tochtergenerationen ausgebildet werden, wenn die BMDCs mit *E. coli* bzw. *B. vulgatus* stimuliert wurden. Es wurden auch in

Cokulturen mit unstimulierten BMDCs neue Tochtergenerationen gebildet, jedoch nicht in demselben Maße.

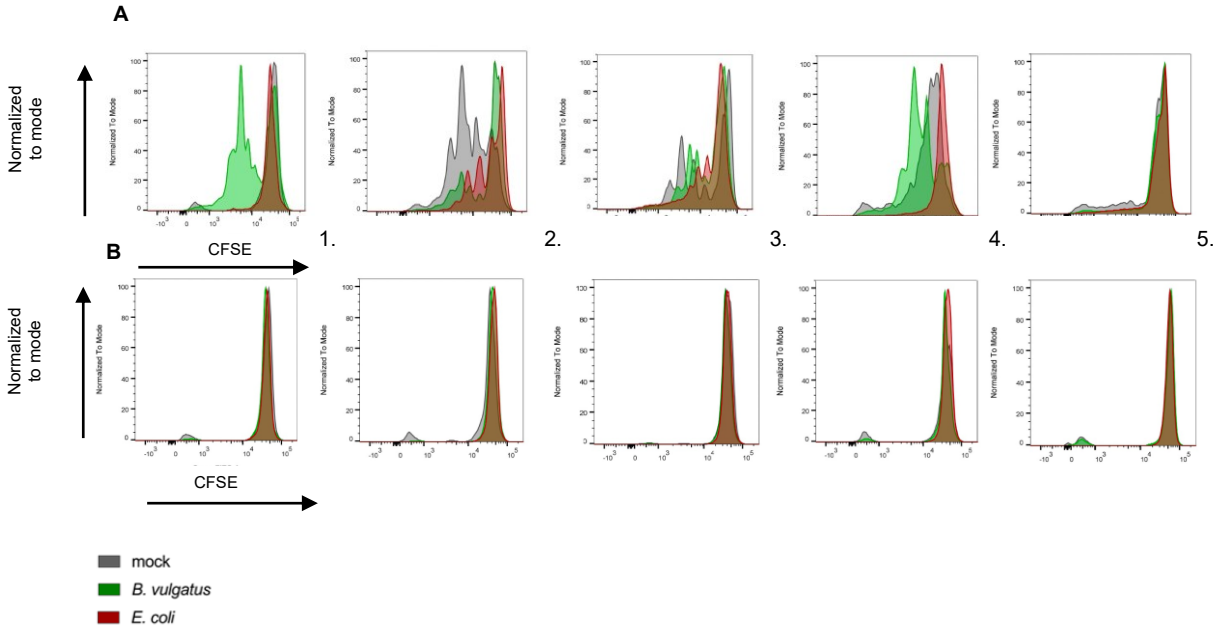

Abbildung 29 Proliferation der CD4⁺ Ova-TCR⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ IL-17⁺T-Zellen, gewonnen aus 5 verschiedenen Mäusen (Diagramm 1.-5.), sichtbar gemacht durch CFSE. Jeder Peak markiert eine neue Zellgeneration. (A) Cokultur von BMDCs mit OT-II-T-Zellen und Zugabe von Ova-Peptid und Stimulation mit mock (grau), B. vulgatus (grün) und E. coli (rot). (B) Cokultur von BMDCs mit OT-II-T-Zellen ohne Zugabe von Ova-Peptid und Stimulation mit mock (grau), B. vulgatus (grün) und E. coli (rot).

Die CTLA-4-Expression auf T-Zellen war in der Cokultur, welche neben BMDCs und OT-II-T-Zellen auch das Ova-Peptid enthielten, etwas erhöht im Vergleich zu jener Cokultur, welche nur BMDCs und OT-II-T-Zellen enthielten. Auch war die CTLA-4-Expression bei Zellen, welche mit *B. vulgatus* stimuliert worden waren, etwas erhöht im Vergleich zur Stimulation mit *E. coli* und mock. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

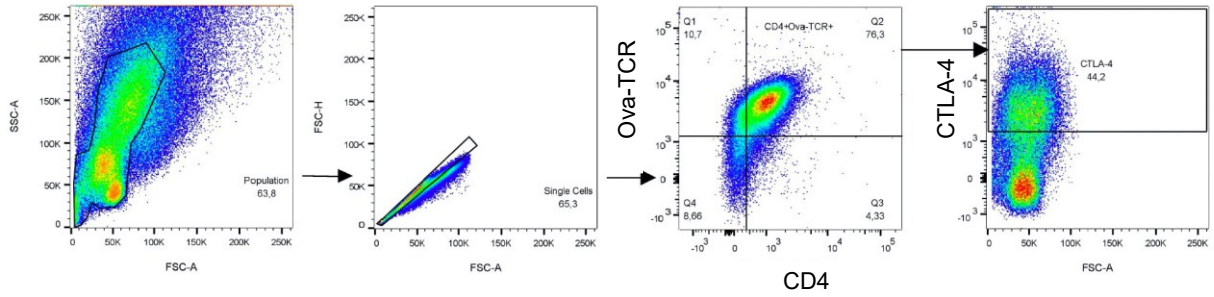

Abbildung 30 Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie der FACS-Auswertung der CTLA-4-Expression CD4⁺ Ova-TCR⁺ T-Zellen.

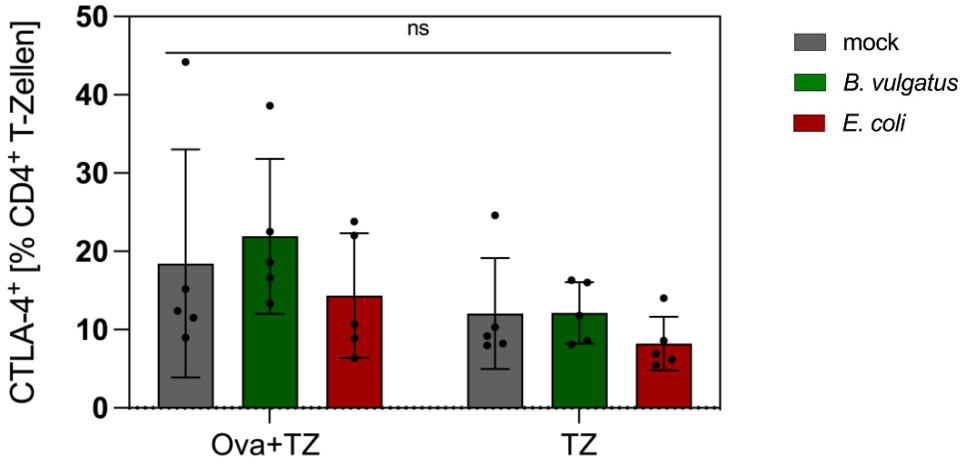

Abbildung 31 CTLA-4-Proteinlevel in CD4⁺ Ova-TCR⁺ T-Zellen in einer Cokultur mit BMDCs nach Stimulation mit *B. vulgatus* bzw. *E. coli.* Die Daten repräsentieren den geometrischen Mean + SD. ns= nicht signifikant.

3.5 *E. coli*-Stimulation führt zu einem positiven Feedbackloop von IκBζ-Expression in dendritischen Zellen

Um zu analysieren, ob die in den Überständen von für 16 h mit mock, *B. vulgatus* und *E. coli* stimulierten WT-BMDCs enthaltenen Zytokine bereits eine Änderung des IκBζ-Proteinlevels in immaturen BMDCs auslösen können, wurden WT-BMDCs mit diesen Überständen für 2 h, 4 h und 16 h stimuliert und mittels FACS anschließend jeweils das IκBζ-Proteinlevel in diesen Zellen bestimmt, siehe Abbildung 33.

Die Ergebnisse zeigten nach 2 h Stimulation ein signifikant erhöhtes IκBζ-Proteinlevel in den BMDCs, die mit Überständen von *E. coli* stimulierten WT-BMDCs stimuliert wurden, im Vergleich zu keiner Stimulation oder einer Stimulation mit den Überständen der unstimulierten oder *B. vulgatus* stimulierten WT-BMDCs. Das IκBζ-Proteinlevel dieser letzten genannten Bedingungen verhielt sich auf gleichem niedrigen Niveau.

Nach 4 h und 16 h Stimulation zeigten sich ähnliche Verhältnisse des IκBζ-Proteinlevels im Vergleich zur 2h-Stimulation. Jedoch sank das IκBζ-Proteinlevel in den mit Überständen der mit *E. coli* stimulierten WT-BMDCs stimulierten BMDCs nach 4 h Stimulation und nochmals nach 16 h Stimulation. Das IκBζ-Proteinlevel in BMDCs der anderen Stimuli zeigte keine Kinetik, hierbei befand sich das IκBζ-Proteinlevel zu jedem Zeitpunkt auf gleich niedrigem Niveau.

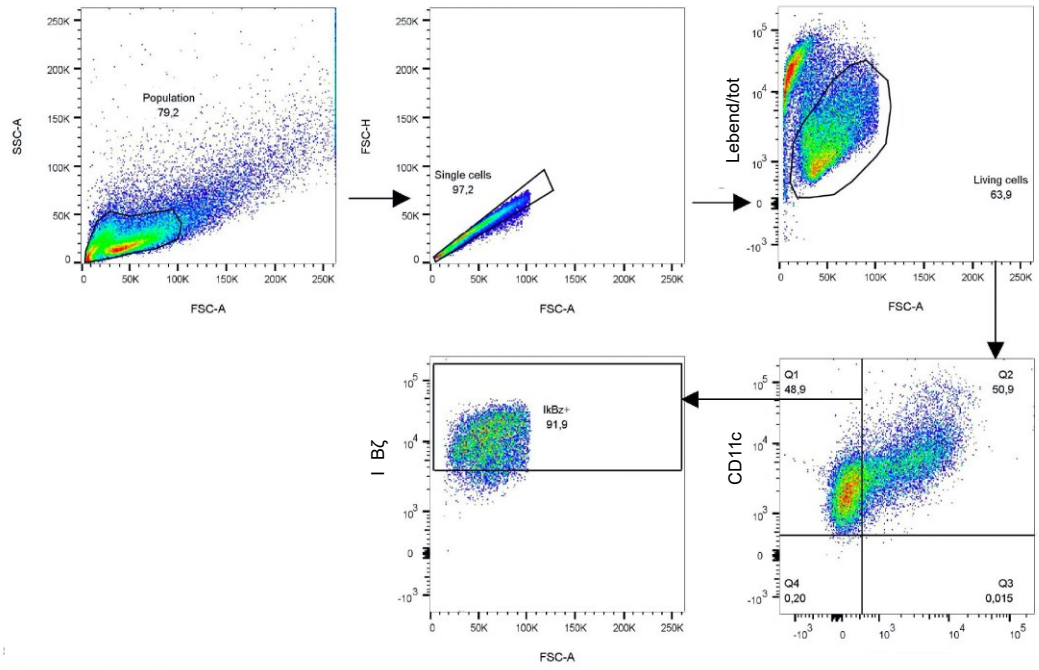

Abbildung 32 Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie der FACS-Auswertung für das IκBζ-Proteinlevel in BMDCs ($CD11c^+$)

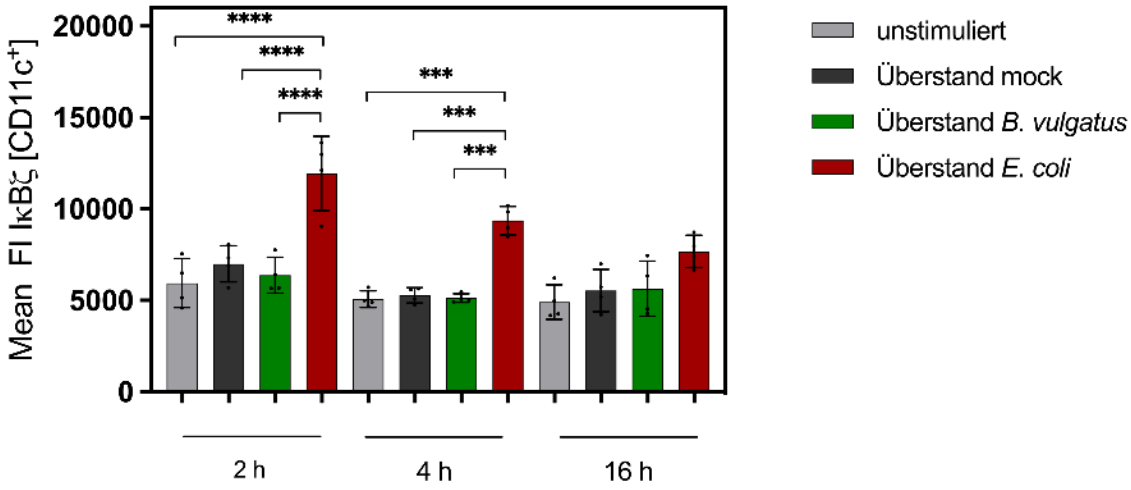

Abbildung 33 IκBζ-Proteinlevel in BMDCs nach Stimulation mit Überständen von unstimulierten, mit mock, *B. vulgatus* und *E. coli* stimulierten BMDCs. Die Daten repräsentieren den geometrischen Mean + SD. ns= nicht signifikant, *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.00005

4 Diskussion

Das Ziel dieser Dissertation war es, den Einfluss kommensaler Darmbakterien auf die T-Zellimmunantwort sowie die Regulierung von MCPIP1 und IκBζ exemplarisch anhand der Darmkommensalen *E. coli* und *B. vulgatus* zu erforschen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen nun diskutiert und in Zusammenhang zu aktuell klinischer Bedeutung eingeordnet werden.

4.1 IκBζ wird *in vitro* im Zeitverlauf durch kommensale Darmbakterien reguliert

Anknüpfend an Vorexperimente wurde in der vorliegenden Dissertation untersucht, ob MCPIP1 und IκBζ nach Stimulation von WT-BMDCs mit Darmkommensalen auch auf Proteinebene im Zeitverlauf reguliert werden. Dass dies bei IκBζ auf mRNA-Ebene der Fall ist, wurde bereits durch vorherige Experimente der Arbeitsgruppe nachgewiesen (Michaelis et al., 2020). In meiner Arbeit konnte gezeigt werden, dass das dies auch auf Proteinebene der Fall ist. Das Proteinlevel von IκBζ wird im Zeitverlauf durch *B. vulgatus* und *E. coli* reguliert. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei Stimulation mit *B. vulgatus* oder *B. vulgatus*-LPS die IκBζ-Proteinlevel signifikant geringer sind als bei Stimulation mit *E. coli* oder *E. coli*-LPS. In vorherigen Studien war gezeigt worden, dass *E. coli* potenziell pro-inflammatorisch wirkt (Waidmann et al., 2003), während *B. vulgatus* vor Autoinflammation schützen bzw. die Abwesenheit von *Bacteroidetes* die Entstehung von Colitis begünstigen kann (Johnson et al., 2017, Waidmann et al., 2003). Studien haben zudem gezeigt, dass IκBζ eine wichtige Rolle in verschiedenen Autoimmunerkrankungen spielt, wie beispielsweise Colitis ulcerosa oder Psoriasis, und dort vermehrt aktiv ist (Lorscheid et al., 2019, Nanki et al., 2020). Interessant zu sehen ist, dass das IκBζ-Proteinlevel nach Stimulation mit *E. coli* bzw. *E. coli*-LPS nach 16h wieder abnimmt. Hierbei könnte sein, dass IκBζ im Zeitverlauf wieder abgebaut wird. Akkumuliert IκBζ, könnte die Transkription des NFκB-Gen im Sinne eines negativen Feedbackloops unterdrückt werden. Dieser negative Feedbackloop könnte zur Vermeidung einer überschüssigen Immunantwort beitragen.

Zudem konnte nachgewiesen werden, dass das LPS die immunogene Struktur ist, welche bereits ausreicht, um eine Produktion von IκBζ zu initiieren, da keine signifikanten Unterschiede zwischen der Stimulation mit LPS und der des kompletten Bakteriums gemessen werden konnten. Das Proteinlevel der von *B. vulgatus* stimulierten BMDCs zeigte im Vergleich zu dem Proteinlevel der mit *E. coli* stimulierten BMDCs wenig Kinetik im Zeitverlauf, was auf eine geringere Immunogenität von *B. vulgatus* hinweist. Diese beiden Bakterien unterscheiden sich überwiegend in der Struktur ihres LPS (Steimle et al., 2016), sodass die Immunogenität auf die Struktur ihres LPS zurückzuführen ist. Die stärkere Immunogenität von *E. coli* im Vergleich zu *B. vulgatus* zeigte sich auch in den Vorexperimenten der Arbeitsgruppe (Steimle et al., 2016, Steimle et al., 2019).

In (Liang et al., 2008) konnte bereits gezeigt werden, dass hohe MCPIP1-Expression in Makrophagen inflammatorische Vorgänge abschwächt. Des Weiteren wurde hierbei gezeigt, dass MCPIP1 eine LPS-induzierte NfκB-Aktivierung hemmt. Auch in (Nagahama et al., 2018) konnte nachgewiesen werden, dass MCPIP1 inflammatorische intestinale Erkrankungen hemmen kann. Bei Messung des MCPIP1 in meiner Arbeit waren die Ergebnisse weniger eindeutig. Bei Stimulation mit *B. vulgatus* zeigte sich ein erhöhtes MCPIP1-Proteinlevel im Vergleich zur Stimulation mit LPS bzw. *E. coli*, welches jedoch nicht signifikant war. Allerdings ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, dass es hierbei eine hohe Standardabweichung gab, sodass die Ursache dafür zu diskutieren ist. Da dies auch in den folgenden Experimenten bei Messung des MCPIP1 mittels FACS der Fall war, kann die Ursache auf den verwendeten MCPIP1-Antikörper zurückzuführen sein. Womöglich bindet dieser nicht fest oder nicht ausschließlich an MCPIP1, sodass die Ergebnisse nicht der exakten MCPIP1-Expression entsprechen. Da zu Zeiten der Durchführung der Experimente der verwendete MCPIP1-Antikörper der einzig verfügbare auf dem Markt war, konnte für die Experimente nicht auf einen anderen Antikörper ausgewichen werden.

Des Weiteren wurden in meiner Arbeit die Experimente durch Zugabe eines TLR4-Inhibitors erweitert, um herauszufinden, ob der TLR4-Rezeptor die

Interaktion zwischen Bakterium und dendritischer Zelle vermittelt. Allgemein bekannt ist, z.B. erwähnt in (Murphy & Weaver, 2018), sowie auch in vorangegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe nachgewiesen, dass LPS mit TLR4 interagiert, was in eine NF-κB-Aktivierung mit wiederum proinflammatorischer Immunantwort mündet (Steimle et al., 2019). In meinen Experimenten waren die Ergebnisse nur bei Stimulation mit *E. coli*-LPS eindeutig. Nach Hemmung des TLR4-Rezeptors war das IκBζ-Proteinlevel deutlich geringer im Vergleich zum Versuch ohne TLR4-Inhibitor. Da dieser Effekt bei Stimulation mit *B. vulgatus* und *B. vulgatus*-LPS sowie *E. coli* nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass der TLR4-Rezeptor zwar eine Rolle bei der Signaltransduktion zwischen Bakterium und dendritischer Zelle spielt, jedoch nicht der einzige Rezeptor ist, welcher hierbei eine Rolle spielt. Auch andere Studien haben gezeigt, dass neben TLR4 auch TLR2 eine Rolle bei der Signalvermittlung spielt (Frick et al., 2010). Hierbei differenzierten sich semi-mature DCs *in vitro* nach Stimulation mit TLR-Liganden (Frick et al., 2010).

Um diese Hypothese weiter zu verfolgen, könnte dahingehend ein weiteres Experiment durchgeführt werden. In diesem könnten zusätzlich neben WT-BMDCs die BMDCs von TLR2-Knockout-, TLR4-Knockout- sowie TLR2/4-Knockout-Mäusen gewonnen und im Zeitverlauf mit *E. coli*, *E. coli*-LPS, *B. vulgatus* und *B. vulgatus*-LPS stimuliert werden. In TLR-Knockout-Mäusen ist der entsprechende TLR-Rezeptor (TLR2 oder TLR4 bzw. TLR2 und TLR4) ausgeschalten, sodass man die Unterschiede des IκBζ- bzw. MCPIP1-Proteinlevels bei Stimulation untersuchen kann. Gleichzeitig ist man dadurch nicht auf die Zugabe und Funktionstüchtigkeit eines TLR-Inhibitors angewiesen und kann durch die Ausschaltung des Rezeptors bereits in der Maus davon ausgehen, dass die entsprechenden TLR-Rezeptoren inaktiv sind. Wäre die Interaktion zwischen Bakterien und dendritischer Zelle nur von TLR2 bzw. TLR4 oder von TLR4 und TLR2 abhängig, würde man vermutlich dann im Vergleich zu den WT-BMDCs eine signifikant geringere IκBζ- bzw. MCPIP1-Expression sehen, bei jenen Mäusen, bei denen der entsprechende Rezeptor inaktiv ist. Da nach dem Experiment 3.1 davon ausgegangen werden kann, dass nicht nur

TLR4 eine Rolle spielt, würde man, sollte sich die Hypothese bestätigen, die stärkste Reduktion des IκBζ- bzw. MCPIP1-Proteinlevels bei Stimulation der TLR2/4-Knockout-BMDCs sehen und eine geringere, aber dennoch vorhandene Reduktion bei TLR2- bzw. TLR4-BDMCS im Vergleich zu WT-BMDCs erwarten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IκBζ im Zeitverlauf durch kommensale Bakterien reguliert wird, wobei bereits das LPS ausreichend ist, um das IκBζ-Proteinlevel zu erhöhen. Zudem sorgen *E. coli* und *E. coli*-LPS für eine höhere IκBζ-Expression im Vergleich zu *B. vulgatus* bzw. *B. vulgatus*-LPS. Bei MCPIP1 konnte dieser Effekt nicht signifikant nachgewiesen werden. Des Weiteren ist die Signaltransduktion zwischen dendritischer Zelle und Bakterium bzw. dendritischer Zelle und LPS TLR4-abhängig, jedoch ist dies nicht der einzige TLR-Rezeptor, der hierbei eine Rolle spielt.

4.2 In gesunden keimfreien Mäusen führt eine Monokolonisierung mit Pathobiont bzw. Symbiont zu keinen Unterschieden der T-Zellpolarisation sowie des Proteinlevels von MCPIP1 und IκBζ

Nachdem nun die Auswirkung der Stimulation dendritischer Zellen mit Pathobiont und Symbiont auf die Proteinlevel von MCPIP1 und IκBζ *in vitro* untersucht wurden, stellte sich die Frage, inwiefern sich diese Ergebnisse auf *in vivo* übertragen lassen. Des Weiteren sollten die daraus resultierende T-Zellpolarisation und die sezernierten Interleukine untersucht werden. Bewirkt ein Pathobiont eine eher proinflammatorische, ein Symbiont eine protektive, antiinflammatorische Immunantwort, wie in der Hypothese vermutet? In (Frick et al., 2006) war bereits untersucht worden, dass eine Kolonisierung mit *E. coli* zu Colitis führt, während eine Kolonisierung mit *B. vulgatus* vor Colitis schützt. Des Weiteren war hier bereits gezeigt worden, dass bei Stimulation mit *E. coli* mature DCs entstehen, während bei Stimulation mit *B. vulgatus* semi-mature DCs entstehen. Zudem reagierten *B. vulgatus* induzierte semi-mature DCs nicht auf Stimuli durch *E. coli*.

Um der Fragestellung *in vivo* weiter nachzugehen, wurden keimfreie WT-Mäuse verwendet, welche mit *B. vulgatus* respektive *E. coli* über das Trinkwasser für zwei Wochen kolonisiert wurden. Anschließend wurden aus den Versuchstieren

BMDCs sowie T-Zellen aus Dünndarm, Kolon und mesenterialen Lymphknoten gewonnen und mittels FACS das IκBζ- bzw. MCPIP1-Proteinlevel und die T-Zellpolarisation (TH1-, TH2-, TH17-, Tregs sowie TH1-like TH17-Zellen) ermittelt. In den mesenterialen Lymphknoten war die Zahl der TH1-like-TH17-Zellen signifikant höher im Vergleich zu Kolon und Dünndarm, jedoch konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der absoluten Zellzahl zwischen den mit *B. vulgatus* und *E. coli* kolonisierten Versuchsgruppen detektiert werden. Ansonsten ließen sich keine signifikanten oder zumindest unterschiedlichen Tendenzen der T-Zellpolarisation ausmachen. Hierbei stellt sich nun die Frage, woran dies liegen könnte. Eine Hypothese ist, dass *in vivo* ein komplexer Organismus mit diversen Immunzellen vorliegt, welche alle miteinander in Beziehung stehen und miteinander kommunizieren. Neben T-Zellen befinden sich in gnotobiotischen Wildtyp-Mäusen auch B-Zellen, welche miteinander interferieren (Maerz et al., 2019). Hierbei hat sich gezeigt, dass regulatorische B-Zellen die Reifung und Funktion dendritischer Zellen hemmen können und somit auch die Differenzierung von TH1-, TH2- und TH17-Zellen. Außerdem ist bekannt, dass regulatorische B-Zellen die Entstehung von Tregs erleichtern können (Maerz et al., 2019). Ein weiterer Punkt könnte sein, dass die Kolonisierung mit den Bakterien mit einem Zeitraum von zwei Wochen zu kurz stattgefunden haben könnte oder die Bakterienkonzentration zu gering gewesen ist, um relevante Auswirkungen auf die T-Zellpolarisation auszuüben. Einerseits ist davon auszugehen, dass gesunde Individuen mit intaktem Immunsystem, was bei den Versuchstieren der Fall war, problemlos auf diverse Bakterien, seien es Symbionten oder Pathobionten, reagieren können, ohne dass diese Tiere krank werden. In gesunden Tieren mit intaktem Immunsystem sind daher auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu erwarten, da Bakterien vom intakten Immunsystem eliminiert werden können. Andererseits haben keimfreie Mäuse zwar die Anlagen für ein intaktes Immunsystem, dieses wird jedoch zunächst durch das fehlende Mikrobiom nicht trainiert. Werden nun dem untrainierten Immunsystem der keimfreien Maus zunächst unbekannte Bakterien präsentiert, wäre zumindest eine Immunreaktion zu erwarten.

Interessant zu wissen wäre, wie die Ergebnisse sich darstellen würden, wenn das Immunsystem nicht voll funktionsfähig bzw. gestört ist. Eine Wiederholung des Versuchs in modifizierter Form (längere Kolonisierungszeiten, Erhöhung der Gruppengröße, erhöhte Bakterienkonzentrationen, Ausschluss der B-Zellen) wäre daher als weitergehender Schritt denkbar. Ein Versuch mit Ausschaltung der B-Zellen wurde mittels $Rag1^{-/-}$ Mäusen im Rahmen dieser Dissertation auch durchgeführt. Dieser wird weiter unten auch diskutiert werden. Ein weiterer zukünftiger Anschlussversuch wäre, keimfreie Mäuse mit *B. vulgatus* zu monokolonisieren mit dem Ziel, diese Mäuse Nachkommen erzeugen zu lassen und anschließend die Immunzellen der Nachkommen auf ihre Differenzierung hin zu untersuchen.

TH17-, TH1- und TH2-Zellen fanden sich in den mesenterialen Lymphknoten vermehrt im Vergleich zu Kolon und Dünndarm, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass in Lymphknoten die T-Zellen aktiviert werden und daher dort gehäuft vorkommen (Miller et al., 2004, Hommel, 2004). In Kolon und Dünndarm sollten sich in gesunden Individuen weniger Immunzellen finden, solange keine Inflammation vorliegt, was auch den Ergebnissen oben entspricht. Denn intestinale Epithelzellen regulieren bei gesunden Individuen die Immunhomöostase und stellen eine Barriere für Mikroben dar (Peterson and Artis, 2014).

Des Weiteren fand sich CTLA-4 auf $CD4^{+}$ $FoxP3^{+}$ T-Zellen (Tregs) vermehrt in den mesenterialen Lymphknoten im Vergleich zu Kolon und Dünndarm. Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, dass CTLA-4 über Antigen-präsentierende Zellen antiproliferativ auf TH17-Zellen wirkt und daher die Funktion hat, das Immunsystem im Schach zu halten und vor Autoimmunerkrankungen zu schützen, wie die Studien von (Van Coillie et al., 2020) zeigten. Es liegt nahe, denn T-Lymphozyten werden in Lymphknoten aktiviert. Zum Einen liegen dann T-Zellen in mesenterialen Lymphknoten vermehrt vor als in Kolon oder Dünndarm. Zum Anderen finden sich an Orten des Immunsystems, wo Zellen aktiviert werden, gleichzeitig auch Mechanismen der Inhibition, um die Balance zu gewährleisten. Damit lässt sich auch erklären, dass

das auf Tregs vorkommende CTLA-4 im Vergleich zu Dünn- und Dickdarm vermehrt in Lymphknoten vorkommt.

Auffallend in den Ergebnissen war, dass MCPIP1 in DCs im Dünndarm signifikant weniger exprimiert wurde im Vergleich zu DCs in Kolon und mesenterialen Lymphknoten. MCPIP1 kommt unter anderem in Monozyten, Makrophagen und anderen Immunzellen vor (Jin et al., 2021). Daher lässt sich auch erklären, weshalb MCPIP1 in den Lymphknoten mehr vorkommt als im Dünndarm. In (Nagahama et al., 2018) wurde gezeigt, dass MCPIP1 auch in intestinalen Epithelzellen vorkommt und im Kolon bei Vorliegen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen die epitheliale Barriere wieder regenerieren kann. In (Liang et al., 2010) war nachgewiesen worden, dass MCPIP1 insbesondere in Milz, Lunge und generell im Darm vorkommt. Vergleichsstudien dazu, ob in Dünndarm weniger MCPIP1 produziert wird als im Kolon, sind bislang nicht beschrieben. Es ist durchaus möglich, dass MCPIP1 im Dünndarm weniger exprimiert wird als im Kolon und könnte in Folgeexperimenten weiter untersucht werden. Wichtig hierbei zu erwähnen ist, dass die Expression von MCPIP1 in meiner Doktorarbeit lediglich in DCs untersucht wurde. In einem weiteren Experiment ließe sich zudem untersuchen, wie die MCPIP1-Expression in anderen Zellspezies vorliegt.

Das IκBζ-Proteinlevel war in Kolon und Lymphknoten bei Analyse im Vergleich zwischen keimfreien und kolonisierten Tieren nicht unterschiedlich. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass IκBζ möglicherweise zum Zeitpunkt der Analyse bereits abgebaut war im Rahmen des unter 4.1 erwähnten negativen Feedbackloops.

Auf mRNA-Ebene fiel die Relation zwischen MCPIP1-Genexpression zu IκBζ-Genexpression in beiden Versuchsgruppen zugunsten der MCPIP1-Expression aus. Wie eingangs erwähnt, stehen MCPIP1 und IκBζ in Beziehung zueinander. Liegt MCPIP1 in einer gewissen Konzentration vor, so wird *Nfkbiz*-mRNA abgebaut, sodass weniger IκBζ gebildet werden kann (Ratio MCPIP1/IκBζ > 1) (Garg et al., 2015). Umgekehrt wird bei einer niedrigen Konzentration von MCPIP1 IκBζ vermehrt exprimiert (Ratio MCPIP1/IκBζ < 1). Somit wird davon ausgegangen, dass bei einem Verhältnis zugunsten MCPIP1

proinflammatorische Vorgänge unterbunden werden, während bei einem Verhältnis zugunsten IκBζ proinflammatorische Vorgänge verstärkt werden (Garg et al., 2015). Da es sich bei den Versuchstieren um gesunde Individuen mit intaktem Immunsystem handelt, ist davon auszugehen, dass eine Kolonisierung mit sowohl einem Pathobiont (*E.* coli) als auch einem Symbiont (*B. vulgatus*) für die Tiere keine Probleme darstellt, d.h. die vermehrte Kolonisierung mit *E. coli* nicht gesondert proinflammatorisch wirkt. Auch wenn die Unterschiede keine statistische Signifikanz aufwiesen, war das Verhältnis in der mit *B. vulgatus* kolonisierten Versuchsgruppe höher verglichen zu der mit *E. coli* kolonisierten Versuchsgruppe, was wiederum der Hypothese entspricht, dass MCPIP1 vermehrt gebildet wird bei Kolonisierung mit einem Symbionten wie *B. vulgatus*.

4.3 In keimfreien Rag1$^{-/-}$ Mäusen führt eine Monokolonisierung mit *B. vulgatus* bzw. *E. coli* nach T-Zelltransfer zu keinen relevanten Unterschieden der T-Zellpolarisation sowie des Proteinlevels von MCPIP1 und IκBζ

Da sich, wie in 4.2 erwähnt, keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen finden ließen, und die Interaktion der B-Zellen mit T-Zellen als eine Ursache vermutet wurde, wurde derselbe Versuch mit gnotobiotischen Rag1$^{-/-}$ Mäusen wiederholt. Rag1$^{-/-}$ Mäuse besitzen keine T- und B-Zellen, sodass die B-Zellen als Störfaktor ausgeschlossen werden konnten. Gnotobiotische Rag1$^{-/-}$ Mäuse wurden für eine Dauer von zwei Wochen mit *B. vulgatus* bzw. *E. coli* über das Trinkwasser kolonisiert. Ein Teil erhielt zudem T-Zellen intraperitoneal injiziert, um die Auswirkung der Kolonisierung mit Bakterien auf die T-Zellpolarisation zu untersuchen. Hierbei ergaben sich sowohl zwischen den einzelnen Versuchsgruppen als auch zwischen Kolon, Dünndarm und mesenterialen Lymphknoten keine signifikanten Unterschiede. Jedoch konnte eine signifikant höhere CTLA-4-Expression auf Tregs der mit *E. coli* kolonisierten Tiere in den mesenterialen Lymphknoten nachgewiesen werden. Dies lässt sich damit erklären, dass *E. coli*, wie bereits oben erwähnt, immunogener wirkt als *B. vulgatus* sowie zur Inflammation führen kann. CTLA-4 auf Tregs wirkt antiproliferativ und versucht autoimmune und inflammatorische Prozesse zu unterdrücken (Tivol et al., 1995). Daher ist die Konsequenz, dass CTLA-4 bei

einer Stimulation mit *E. coli* auf Tregs höher exprimiert werden muss. Des Weiteren werden in den Lymphknoten T-Zellen polarisiert und aktiviert. CTLA-4 wird zudem als Rezeptor auf T-Zellen exprimiert und kann über die Bindung seiner Liganden mit APC eine T-Zell-Aktivierung wie der von TH17-Zellen hemmen (Van Coillie et al., 2020, Tivol et al., 1995, Krummel and Allison, 1995). Es liegt daher nahe, dass die CTLA-4-Expression auf T-Zellen in Lymphknoten höher ist als in Kolon und Dünndarm.

Weitergehend zeigte sich, dass bei Kolonisierung mit *E. coli* signifikant mehr TH2-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten nachgewiesen werden konnten als bei keimfreien, nicht-kolonisierten Tieren, sowie auch im Vergleich zu allen Versuchsgruppen in Kolon und Dünndarm. Dass TH2-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten vermehrt vorkommen, hat mit der Aktivierung von T-Zellen in Lymphknoten zu tun. *E. coli* wirkt immunogener und sorgt daher für eine stärkere Bildung von T-Zellen und damit auch der TH2-Zellpolarisation.

Weitergehend kann diskutiert werden, weshalb sich keine signifikanten Unterschiede der T-Zellpolarisation haben messen lassen. Hierbei ist anzumerken, dass in der FACS-Auswertung generell wenige T-Zellen vorhanden waren. Zu diskutieren ist, ob die injizierte T-Zellzahl ausreichend war, um eine ausreichende Immunantwort und damit T-Zellpolarisation zu erzielen. Des Weiteren könnte man den Versuch mit einer höheren Tierzahl und längeren Kolonisierungszeiten optimieren.

4.4 T-Zellpolarisation und -proliferation nach *in vitro* Stimulation einer Cokultur von WT-BMDCs und OT-II-T-Zellen mit *B. vulgatus* und *E. coli* sowie Feedbackloop zwischen dendritischen und T-Zellen

Des Weiteren wurde untersucht, welchen Einfluss mit *E. coli* bzw. *B. vulgatus* stimulierte BMDCs auf die T-Zellproliferation sowie die T-Zellpolarisation (Tregs und TH17-Zellen) haben. T-Zellen von OT-II-Mäusen exprimieren einen OT-II-T-Zellrezeptor, der spezifisch für das Hühner-Ovalbumin 323-339 (Ova-Peptid) ist. Ovalbumin ist für das Immunsystem ein Antigen, weshalb es von dendritischen Zellen erkannt und mittels MHC-II-Molekülen auf der Oberfläche der dendritischen Zellen den naiven, $CD4^+$ T-Zellen präsentiert wird. Das durch MHC-

II präsentierte Ovalbumin bindet spezifisch an OT-II-T-Zellrezeptoren und sorgt somit für eine Aktivierung der naiven, $CD4^+$ T-Zellen. Diese Eigenschaft wurde hierbei zunutze gemacht. Ohne Ova-Peptid findet keine Erkennung/Bindung an OT-II-Rezeptoren statt und somit auch keine Proliferation der T-Zellen, selbst wenn die DCs mit Darmkommensalen stimuliert werden. Ist Ova-Peptid vorhanden, werden in einer Co-Kultur mit BMDCs und T-Zellen bei Stimulation mit Darmkommensalen neue Tochtergenerationen der T-Zellen gebildet werden und dies mehr als bei fehlender Stimulation (ohne Darmkommensalen). Dies bedeutet, dass die Darmkommensalen *E. coli* und *B. vulgatus* vermehrt zur Proliferation und Differenzierung von naiven T-Zellen beitragen. Das liegt daran, dass bei Stimulation mit Darmkommensalen naiven T-Zellen über DCs Antigene jener Bakterien präsentiert werden, sodass vermehrt die T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung angeregt werden. Hinsichtlich der Polarisation der T-Zellen (Tregs und TH17-Zellen) ergaben sich zwischen den Stimulationen mit Pathobiont, Symbiont sowie ohne Bakterium keine signifikanten Unterschiede. Es konnte nicht nachgewiesen werden, dass *E. coli*, wie zunächst in der Hypothese vermutet, vermehrt inflammatorisch, also zugunsten der TH17-Zellen wirkt und *B. vulgatus* eher protektiv, also zugunsten der Tregs wirkt. Beide Bakterien wirkten auf beide T-Zellpopulationen in gleichem Maße.

Hierbei stellt sich auch die Frage, ob es einen Feedbackloop von Seiten der T-Zellen auf DCs gibt. Schaut man sich die Diagramme in 23A und B an, zeigt sich, dass bei einer Kultur mit nur BMDCS bzw. einer Kultur von BMDCs mit Ova-Peptid die MCPIP1- und IκBζ-Proteinlevel auf gleicher Höhe sind. Sobald in die Kultur mit BMDCs T-Zellen hinzukommen, sinken die MCPIP1- und IκBζ-Level in BMDCs in allen Stimulationsgruppen signifikant. Durch Stimulation mit Darmkommensalen kann sich ihr Proteinlevel in BMDCs erhöhen. Kommunizieren DCs nun auch mit T-Zellen, fallen gemäß den Ergebnissen die Proteinlevel von MCPIP1 und IκBζ in BMDCs ab. Dies muss im Umkehrschluss bedeuten, dass T-Zellen mittels eines Feedbackloops, vermutlich in Form von Zytokinen, auf DCs rückwirken können. Ein solcher Feedbackloop ist bereits auch in der Literatur beschrieben. In (Darrasse-Jeze et al., 2009) wurde gezeigt, dass *in vitro* die Entfernung von T-Zellen zu einem Anstieg an dendritischen

Zellen führt. Auch in (Li et al., 2022) wurde ein solcher Feedbackloop zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen beschrieben. Hierbei wurden in (Li et al., 2022) drei Arten von Feedbackloops zwischen Tregs und dendritischen Zellen gezeigt: die Interaktion zwischen CTLA-4 auf Tregs mit dem Ligand CD80 auf dendritischen Zellen, der PDL-1/PD-1-Signalweg zwischen Tregs und dendritischen Zellen sowie die Interaktion zwischen TCR auf Tregs und MHC-II auf dendritischen Zellen. Mittels dieser drei Feedbackloops können einerseits DCs die Tregs in der Bildung ihrer Subtypen beeinflussen. Andererseits beeinflussen die Tregs die Toleranz, die Maturität der DCs sowie die Fähigkeit der DCs, Antigene zu präsentieren. Dies erfolgt über verschiedene inhibitorische Zytokine, wie IL-10 und TGF-β, welche sowohl von DCs als auch von Tregs ausgeschüttet werden können. Daraus lässt sich vermuten, dass dieser Feedbackloop zwischen DCs und Tregs einen Einfluss auf Inflammation und Homöostase hat. Dank dieser inhibitorischen Effekte wird eine überschießende Immunantwort, eine Inflammation, vermieden. Funktioniert der Feedbackloop nicht, fehlen diese Inhibitoren.

Ein weitergehendes Experiment könnte sein, die Überstände dieser Co-Kultur auf die die darin enthaltenen Zytokine, insbesondere IL-10 und TGF-β, zu untersuchen, z.B. mithilfe eines ELISA, um herauszufinden, welche Zytokine bei diesem Feedbackloop eine wesentliche Rolle spielen.

4.5 *E. coli*-Stimulation führt zu einem Feedbackloop von IκBζ-Expression in dendritischen Zellen

Anknüpfend an das Experiment 3.1 wurde untersucht, ob bereits die Überstände von mit *E. coli* bzw. *B. vulgatus* stimulierten Zellen ausreichen, um eine erhöhte IκBζ-Expression in dendritischen Zellen auszulösen. Dies konnte für die Stimulation mit Überständen aus mit *E. coli* stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Die Stimulation mit lediglich den Überständen von mit *E. coli* stimulierten DCs führt demnach zu einer erhöhten IκBζ-Expression in dendritischen Zellen. Vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe hatten bereits gezeigt, dass durch *B. vulgatus* stimulierte, immature DCs zu semi-maturen DCs werden, welche mehr IL-6 und weniger TNFα produzieren. Bei Stimulation der immaturen

DCs mit *E. coli* entstehen hingegen mature DCs, welche weniger IL-6 und mehr TNFαproduzieren (Frick et al., 2006, Muller et al., 2008). IL-6 nimmt eine immunregulatorische Rolle ein, während dagegen TNFα eine pro-inflammatorische Wirkung zugeschrieben wird. Des Weiteren wurde in jenen Voruntersuchungen gezeigt, dass mit *B. vulgatus* stimulierte, semi-mature DCs nicht mehr auf eine Stimulation mit *E. coli* ansprechen in Bezug auf ihre Maturation oder die TNFα Produktion. Semi-mature DCs sind durch eine Stimulation mit *B. vulgatus* und die darauf resultierende IL-6-Ausschüttung somit quasi geschützt. Durchaus anzunehmen ist demnach, dass in den Überständen der mit *E. coli* stimulierten DCs eine andere Zytokinzusammensetzung vorliegt als bei der mit *B. vulgatus* stimulierten DCs: möglicherweise IL-6 bei *B. vulgatus*, TNFα bei *E. coli*. Damit könnte allein das Vorhandensein von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNFα bereits ausreichen, um die IκBζ-Expression in DCs zu erhöhen.

Auch hier war wiederum eine Kinetik der IκBζ-Proteinlevel im Zeitverlauf sichtbar. Wie bereits unter 4.1 erwähnt, könnte bei Akkumulation von IκBζ die Transkription des NFκB-Gen im Sinne eines negativen Feedbackloops unterdrückt werden. Dieser negative Feedbackloop könnte zur Vermeidung einer überschüssigen Immunantwort beitragen. Es scheinen allein die Überstände von mit *E. coli* bzw. *B. vulgatus* stimulierten Zellen auszureichen, um ebenfalls einen solchen Feedbackloop der IκBζ-Expression zu erzeugen.

Bei Stimulation von DCs mit Überständen von mit *B. vulgatus* stimulierten Zellen konnte im Vergleich zu den unstimulierten DCs eine vergleichbare IκBζ-Expression nachgewiesen werden. Dies ist zum einen durch die geringere Immunogenität von *B. vulgatus* im Vergleich zu *E. coli* zu erklären, die sich bereits in Voruntersuchungen der Gruppe gezeigt hatte (Steimle et al., 2019). Zum anderen führt *B. vulgatus* als Symbiont zu einer geringeren IκBζ-Expression und damit zu einer geringeren inflammatorischen Reaktion. Eine geringere inflammatorische Reaktion auf *B. vulgatus* im Sinne einer geringeren TNFα-Produktion und einer vermehrten IL-6-Sekretion zeigten, wie bereits genannt,

auch Vorexperimente der Arbeitsgruppe (Steimle et al., 2019, Michaelis et al., 2020, Frick et al., 2006, Muller et al., 2008).

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Doktorarbeit soll der Frage nachgehen, ob MCPIP-1 und IκBζ im Zeitverlauf durch kommensale Bakterien (*E. coli* als Pathobiont und *B. vulgatus* als Symbiont) reguliert werden, ob diese Regulation TLR-4 abhängig ist und inwiefern kommensale Darmbakterien die Proliferation und Polarisation naiver T-Zellen beeinflussen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *in vitro E. coli* zu einem erhöhten IκBζ-Proteinlevel in dendritischen Zellen führt und Toll-like-Rezeptoren bei der Signalvermittlung zwischen Bakterium und dendritischer Zelle eine Rolle spielen. TLR4-Rezeptoren scheinen nicht allein verantwortlich für die Interaktion zwischen Bakterium und dendritischer Zelle zu sein. Neben TLR4 sind vermutlich auch TLR2-Rezeptoren an der Signaltransduktion verantwortlich. *B. vulgatus* führt im Vergleich zu *E. coli* zu einem niedrigerem IκBζ-Proteinlevel in dendritischen Zellen. Zudem ist bereits allein das LPS des jeweiligen Bakteriums ausreichend, um dieselbe Antwort auszulösen. Bereits allein die Überstände mit *E. coli* stimulierten BMDCs waren ausreichend, um nach einer Stimulation von BMDCs mit diesen Überständen ein erhöhtes IκBζ -Proteinlevel zu messen. Des Weiteren führte die Stimulation mit IκBζ zu einem Feedbackloop in dendritischen Zellen. Steigt das IκBζ-Proteinlevel, könnte die Transkription des NFκB-Gen im Sinne eines negativen Feedbackloops unterdrückt werden. Dieser negative Feedbackloop könnte zur Vermeidung einer überschüssigen Immunantwort dienen.

In vivo konnten sich die *in vitro* gezeigten Ergebnisse nicht bestätigen. *In vivo* zeigte sich kein Unterschied des IκBζ- und MCPIP1-Proteinlevels in dendritischen Zellen nach Kolonisation mit Darmkommensalen. Im Dünndarm konnten erniedrigte MCPIP1-Konzentrationen nachgewiesen werden, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass MCPIP1 im Dünndarm weniger gebildet wird. Der fehlende Unterschied des IκBζ-Proteinlevels in dendritischen Zellen

zwischen keimfreien und kolonisierten Tieren könnte darauf hindeuten, dass IκBζ zum Zeitpunkt der Analyse bereits durch den oben genannten Feedbackloop abgebaut sein gewesen ist.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit *E. coli* als auch *B. vulgatus* via Antigenpräsentation über dendritische Zellen die T-Zellproliferation anregt. T-Zellen können mit einem Feedbackloop mit dendritischen Zellen interagieren. Unterschiede bezüglich der T-Zellpolarisation *in vivo* zwischen der Kolonisierung mit Pathobiont bzw. Symbiont ergaben sich nicht. CTLA-4 mit bekannter anti-proliferativer Funktion auf TH17-Zellen ist bei Stimulation mit *E. coli* erhöht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass IκBζ und MCPIP1 eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf Darmkommensalen spielen.

Durch weitere Aufklärung der Mechanismen der Immunantwort als Reaktion auf kommensale Darmbakterien könnten die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsschrift dabei helfen, die Pathogenese TH17-vermittelter Autoimmunerkrankungen, insbesondere jene der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, besser zu verstehen und dadurch in Zukunft neue, zielgerichtete Therapiemöglichkeiten, wie etwa die Verwendung symbiotischer Darmbakterien, wie *B. vulgatus,* oder ihrer Bestandteile, entwickeln zu können.

6 Literaturverzeichnis

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V., RIVINO, L., GEGINAT, J., JARROSSAY, D., GATTORNO, M., LANZAVECCHIA, A., SALLUSTO, F. & NAPOLITANI, G. 2007. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol,* 8**,** 639-46.

ALEXANDER, C. & RIETSCHEL, E. T. 2001. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res,* 7**,** 167-202.

ANNUNZIATO, F., COSMI, L., SANTARLASCI, V., MAGGI, L., LIOTTA, F., MAZZINGHI, B., PARENTE, E., FILI, L., FERRI, S., FROSALI, F., GIUDICI, F., ROMAGNANI, P., PARRONCHI, P., TONELLI, F., MAGGI, E. & ROMAGNANI, S. 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med,* 204**,** 1849-61.

BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature,* 392**,** 245-52.

BJORKBACKA, H., FITZGERALD, K. A., HUET, F., LI, X., GREGORY, J. A., LEE, M. A., ORDIJA, C. M., DOWLEY, N. E., GOLENBOCK, D. T. & FREEMAN, M. W. 2004. The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades. *Physiol Genomics,* 19**,** 319-30.

BRADLEY, L. M., DALTON, D. K. & CROFT, M. 1996. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J Immunol,* 157**,** 1350-8.

CATANA, C. S., BERINDAN NEAGOE, I., COZMA, V., MAGDAS, C., TABARAN, F. & DUMITRASCU, D. L. 2015. Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol,* 21**,** 5823-30.

CHASSAING, B. & DARFEUILLE-MICHAUD, A. 2011. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology,* 140**,** 1720-28.

CHOW, J. & MAZMANIAN, S. K. 2010. A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. *Cell Host Microbe,* 7**,** 265-76.

COHN, L., HOMER, R. J., MARINOV, A., RANKIN, J. & BOTTOMLY, K. 1997. Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med,* 186**,** 1737-47.

COSKUN, M. 2014. Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease. *Front Med (Lausanne),* 1**,** 24.

COSMI, L., DE PALMA, R., SANTARLASCI, V., MAGGI, L., CAPONE, M., FROSALI, F., RODOLICO, G., QUERCI, V., ABBATE, G., ANGELI, R., BERRINO, L., FAMBRINI, M., CAPRONI, M., TONELLI, F., LAZZERI, E., PARRONCHI, P., LIOTTA, F., MAGGI, E., ROMAGNANI, S. & ANNUNZIATO, F. 2008. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med,* 205**,** 1903-16.

DARRASSE-JEZE, G., DEROUBAIX, S., MOUQUET, H., VICTORA, G. D., EISENREICH, T., YAO, K. H., MASILAMANI, R. F., DUSTIN, M. L., RUDENSKY, A., LIU, K. & NUSSENZWEIG, M. C. 2009. Feedback

control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J Exp Med,* 206**,** 1853-62.
DOMINGUEZ-BELLO, M. G., COSTELLO, E. K., CONTRERAS, M., MAGRIS, M., HIDALGO, G., FIERER, N. & KNIGHT, R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 107**,** 11971-5.
DONALDSON, G. P., LEE, S. M. & MAZMANIAN, S. K. 2016. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol,* 14**,** 20-32.
ECKBURG, P. B., BIK, E. M., BERNSTEIN, C. N., PURDOM, E., DETHLEFSEN, L., SARGENT, M., GILL, S. R., NELSON, K. E. & RELMAN, D. A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science,* 308**,** 1635-8.
FIOCCHI, C. 1998. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology,* 115**,** 182-205.
FRICK, J. S., GRUNEBACH, F. & AUTENRIETH, I. B. 2010. Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *Int J Med Microbiol,* 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.
GARG, A. V., AMATYA, N., CHEN, K., CRUZ, J. A., GROVER, P., WHIBLEY, N., CONTI, H. R., HERNANDEZ MIR, G., SIRAKOVA, T., CHILDS, E. C., SMITHGALL, T. E., BISWAS, P. S., KOLLS, J. K., MCGEACHY, M. J., KOLATTUKUDY, P. E. & GAFFEN, S. L. 2015. MCPIP1 Endoribonuclease Activity Negatively Regulates Interleukin-17-Mediated Signaling and Inflammation. *Immunity,* 43**,** 475-87.
GRONBACH, K., FLADE, I., HOLST, O., LINDNER, B., RUSCHEWEYH, H. J., WITTMANN, A., MENZ, S., SCHWIERTZ, A., ADAM, P., STECHER, B., JOSENHANS, C., SUERBAUM, S., GRUBER, A. D., KULIK, A., HUSON, D., AUTENRIETH, I. B. & FRICK, J. S. 2014. Endotoxicity of lipopolysaccharide as a determinant of T-cell-mediated colitis induction in mice. *Gastroenterology,* 146**,** 765-75.
HILDEBRAND, D. G., ALEXANDER, E., HORBER, S., LEHLE, S., OBERMAYER, K., MUNCK, N. A., ROTHFUSS, O., FRICK, J. S., MORIMATSU, M., SCHMITZ, I., ROTH, J., EHRCHEN, J. M., ESSMANN, F. & SCHULZE-OSTHOFF, K. 2013. IkappaBzeta is a transcriptional key regulator of CCL2/MCP-1. *J Immunol,* 190**,** 4812-20.
HILLION, S., ARLEEVSKAYA, M. I., BLANCO, P., BORDRON, A., BROOKS, W. H., CESBRON, J. Y., KAVERI, S., VIVIER, E. & RENAUDINEAU, Y. 2020. The Innate Part of the Adaptive Immune System. *Clin Rev Allergy Immunol,* 58**,** 151-154.
HOMMEL, M. 2004. On the dynamics of T-cell activation in lymph nodes. *Immunol Cell Biol,* 82**,** 62-6.
HOVHANNISYAN, Z., TREATMAN, J., LITTMAN, D. R. & MAYER, L. 2011. Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed

intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology,* 140**,** 957-65.
IVANOV, II, MCKENZIE, B. S., ZHOU, L., TADOKORO, C. E., LEPELLEY, A., LAFAILLE, J. J., CUA, D. J. & LITTMAN, D. R. 2006. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell,* 126**,** 1121-33.
JACKSON, M. A., GOODRICH, J. K., MAXAN, M. E., FREEDBERG, D. E., ABRAMS, J. A., POOLE, A. C., SUTTER, J. L., WELTER, D., LEY, R. E., BELL, J. T., SPECTOR, T. D. & STEVES, C. J. 2016. Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota. *Gut,* 65**,** 749-56.
JIN, Z., ZHENG, E., SARELI, C., KOLATTUKUDY, P. E. & NIU, J. 2021. Monocyte Chemotactic Protein-Induced Protein 1 (MCPIP-1): A Key Player of Host Defense and Immune Regulation. *Front Immunol,* 12**,** 727861.
JOHANSSON, M. E., PHILLIPSON, M., PETERSSON, J., VELCICH, A., HOLM, L. & HANSSON, G. C. 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 105**,** 15064-9.
JOHNSON, E. L., HEAVER, S. L., WALTERS, W. A. & LEY, R. E. 2017. Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. *J Mol Med (Berl),* 95**,** 1-8.
KAPITAN, M., NIEMIEC, M. J., STEIMLE, A., FRICK, J. S. & JACOBSEN, I. D. 2019. Fungi as Part of the Microbiota and Interactions with Intestinal Bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol,* 422**,** 265-301.
KHOR, B., GARDET, A. & XAVIER, R. J. 2011. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature,* 474**,** 307-17.
KRUMMEL, M. F. & ALLISON, J. P. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med,* 182**,** 459-65.
KULLBERG, M. C., JANKOVIC, D., FENG, C. G., HUE, S., GORELICK, P. L., MCKENZIE, B. S., CUA, D. J., POWRIE, F., CHEEVER, A. W., MALOY, K. J. & SHER, A. 2006. IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis. *J Exp Med,* 203**,** 2485-94.
LEE, G. R. 2018. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *Int J Mol Sci,* 19.
LI, R., LI, H., YANG, X., HU, H., LIU, P. & LIU, H. 2022. Crosstalk between dendritic cells and regulatory T cells: Protective effect and therapeutic potential in multiple sclerosis. *Front Immunol,* 13**,** 970508.
LIANG, J., SAAD, Y., LEI, T., WANG, J., QI, D., YANG, Q., KOLATTUKUDY, P. E. & FU, M. 2010. MCP-induced protein 1 deubiquitinates TRAF proteins and negatively regulates JNK and NF-kappaB signaling. *J Exp Med,* 207**,** 2959-73.
LIANG, J., WANG, J., AZFER, A., SONG, W., TROMP, G., KOLATTUKUDY, P. E. & FU, M. 2008. A novel CCCH-zinc finger protein family regulates proinflammatory activation of macrophages. *J Biol Chem,* 283**,** 6337-46.
LORSCHEID, S., MULLER, A., LOFFLER, J., RESCH, C., BUCHER, P., KURSCHUS, F. C., WAISMAN, A., SCHAKEL, K., HAILFINGER, S., SCHULZE-OSTHOFF, K. & KRAMER, D. 2019. Keratinocyte-derived

IkappaBzeta drives psoriasis and associated systemic inflammation. *JCI Insight,* 4.
MACDONALD, T. T., MONTELEONE, G. & PENDER, S. L. 2000. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol,* 51**,** 2-9.
MAERZ, J. K., TROSTEL, C., LANGE, A., PARUSEL, R., MICHAELIS, L., SCHAFER, A., YAO, H., LOW, H. C. & FRICK, J. S. 2019. Bacterial Immunogenicity Is Critical for the Induction of Regulatory B Cells in Suppressing Inflammatory Immune Responses. *Front Immunol,* 10**,** 3093.
MARTIN-FONTECHA, A., THOMSEN, L. L., BRETT, S., GERARD, C., LIPP, M., LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F. 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol,* 5**,** 1260-5.
MARTINEZ, C., ANTOLIN, M., SANTOS, J., TORREJON, A., CASELLAS, F., BORRUEL, N., GUARNER, F. & MALAGELADA, J. R. 2008. Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission. *Am J Gastroenterol,* 103**,** 643-8.
MCCOMB, S., THIRIOT, A., AKACHE, B., KRISHNAN, L. & STARK, F. 2019. Introduction to the Immune System. *Methods Mol Biol,* 2024**,** 1-24.
MICHAELIS, L., TRESS, M., LOW, H. C., KLEES, J., KLAMETH, C., LANGE, A., GRIESSHAMMER, A., SCHAFER, A., MENZ, S., STEIMLE, A., SCHULZE-OSTHOFF, K. & FRICK, J. S. 2020. Gut Commensal-Induced IkappaBzeta Expression in Dendritic Cells Influences the Th17 Response. *Front Immunol,* 11**,** 612336.
MILLER, M. J., SAFRINA, O., PARKER, I. & CAHALAN, M. D. 2004. Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *J Exp Med,* 200**,** 847-56.
MONIN, L., GUDJONSSON, J. E., CHILDS, E. E., AMATYA, N., XING, X., VERMA, A. H., COLEMAN, B. M., GARG, A. V., KILLEEN, M., MATHERS, A., WARD, N. L. & GAFFEN, S. L. 2017. MCPIP1/Regnase-1 Restricts IL-17A- and IL-17C-Dependent Skin Inflammation. *J Immunol,* 198**,** 767-775.
MULLER, M., FINK, K., GEISEL, J., KAHL, F., JILGE, B., REIMANN, J., MACH, N., AUTENRIETH, I. B. & FRICK, J. S. 2008. Intestinal colonization of IL-2 deficient mice with non-colitogenic B. vulgatus prevents DC maturation and T-cell polarization. *PLoS One,* 3**,** e2376.
NAGAHAMA, Y., SHIMODA, M., MAO, G., SINGH, S. K., KOZAKAI, Y., SUN, X., MOTOOKA, D., NAKAMURA, S., TANAKA, H., SATOH, T., MAEDA, K. & AKIRA, S. 2018. Regnase-1 controls colon epithelial regeneration via regulation of mTOR and purine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 115**,** 11036-11041.
NANKI, K., FUJII, M., SHIMOKAWA, M., MATANO, M., NISHIKORI, S., DATE, S., TAKANO, A., TOSHIMITSU, K., OHTA, Y., TAKAHASHI, S., SUGIMOTO, S., ISHIMARU, K., KAWASAKI, K., NAGAI, Y., ISHII, R., YOSHIDA, K., SASAKI, N., HIBI, T., ISHIHARA, S., KANAI, T. & SATO, T. 2020. Somatic inflammatory gene mutations in human ulcerative colitis epithelium. *Nature,* 577**,** 254-259.

OKAMOTO, K., IWAI, Y., OH-HORA, M., YAMAMOTO, M., MORIO, T., AOKI, K., OHYA, K., JETTEN, A. M., AKIRA, S., MUTA, T. & TAKAYANAGI, H. 2010. IkappaBzeta regulates T(H)17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature,* 464**,** 1381-5.

OTT, S. J., MUSFELDT, M., WENDEROTH, D. F., HAMPE, J., BRANT, O., FOLSCH, U. R., TIMMIS, K. N. & SCHREIBER, S. 2004. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut,* 53**,** 685-93.

OWYANG, A. M., ZAPH, C., WILSON, E. H., GUILD, K. J., MCCLANAHAN, T., MILLER, H. R., CUA, D. J., GOLDSCHMIDT, M., HUNTER, C. A., KASTELEIN, R. A. & ARTIS, D. 2006. Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *J Exp Med,* 203**,** 843-9.

PELLETIER, M., MAGGI, L., MICHELETTI, A., LAZZERI, E., TAMASSIA, N., COSTANTINI, C., COSMI, L., LUNARDI, C., ANNUNZIATO, F., ROMAGNANI, S. & CASSATELLA, M. A. 2010. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood,* 115**,** 335-43.

PETERSON, L. W. & ARTIS, D. 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol,* 14**,** 141-53.

PULENDRAN, B. & ARTIS, D. 2012. New paradigms in type 2 immunity. *Science,* 337**,** 431-5.

RAETZ, C. R. & WHITFIELD, C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem,* 71**,** 635-700.

ROBERTSON, J. M., JENSEN, P. E. & EVAVOLD, B. D. 2000. DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope. *J Immunol,* 164**,** 4706-12.

ROBINSON, D. S., HAMID, Q., YING, S., TSICOPOULOS, A., BARKANS, J., BENTLEY, A. M., CORRIGAN, C., DURHAM, S. R. & KAY, A. B. 1992. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med,* 326**,** 298-304.

ROMAGNANI, S. 1994. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol,* 12**,** 227-57.

ROUND, J. L. & MAZMANIAN, S. K. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol,* 9**,** 313-23.

RUTELLA, S. & LOCATELLI, F. 2011. Intestinal dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol,* 17**,** 3761-75.

SARTOR, R. B. 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology,* 134**,** 577-94.

SENDER, R., FUCHS, S. & MILO, R. 2016. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell,* 164**,** 337-40.

SHEVACH, E. M., DIPAOLO, R. A., ANDERSSON, J., ZHAO, D. M., STEPHENS, G. L. & THORNTON, A. M. 2006. The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol Rev,* 212**,** 60-73.

STEIMLE, A., AUTENRIETH, I. B. & FRICK, J. S. 2016. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *Int J Med Microbiol,* 306**,** 290-301.
STEIMLE, A. & FRICK, J. S. 2016. Molecular Mechanisms of Induction of Tolerant and Tolerogenic Intestinal Dendritic Cells in Mice. *J Immunol Res,* 2016**,** 1958650.
STEIMLE, A., MICHAELIS, L., DI LORENZO, F., KLIEM, T., MUNZNER, T., MAERZ, J. K., SCHAFER, A., LANGE, A., PARUSEL, R., GRONBACH, K., FUCHS, K., SILIPO, A., OZ, H. H., PICHLER, B. J., AUTENRIETH, I. B., MOLINARO, A. & FRICK, J. S. 2019. Weak Agonistic LPS Restores Intestinal Immune Homeostasis. *Mol Ther,* 27**,** 1974-1991.
STOCKINGER, B. & OMENETTI, S. 2017. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat Rev Immunol,* 17**,** 535-544.
TIVOL, E. A., BORRIELLO, F., SCHWEITZER, A. N., LYNCH, W. P., BLUESTONE, J. A. & SHARPE, A. H. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity,* 3**,** 541-7.
TOMAR, N. & DE, R. K. 2014. A brief outline of the immune system. *Methods Mol Biol,* 1184**,** 3-12.
UBEDA, C. & PAMER, E. G. 2012. Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends Immunol,* 33**,** 459-66.
UEHATA, T. & AKIRA, S. 2013. mRNA degradation by the endoribonuclease Regnase-1/ZC3H12a/MCPIP-1. *Biochim Biophys Acta,* 1829**,** 708-13.
VAN COILLIE, S., WIERNICKI, B. & XU, J. 2020. Molecular and Cellular Functions of CTLA-4. *Adv Exp Med Biol,* 1248**,** 7-32.
VAN DER SLUIS, M., DE KONING, B. A., DE BRUIJN, A. C., VELCICH, A., MEIJERINK, J. P., VAN GOUDOEVER, J. B., BULLER, H. A., DEKKER, J., VAN SEUNINGEN, I., RENES, I. B. & EINERHAND, A. W. 2006. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology,* 131**,** 117-29.
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.
WEHKAMP, J. & FRICK, J. S. 2017. Microbiome and chronic inflammatory bowel diseases. *J Mol Med (Berl),* 95**,** 21-28.
WEHKAMP, J., SALZMAN, N. H., PORTER, E., NUDING, S., WEICHENTHAL, M., PETRAS, R. E., SHEN, B., SCHAEFFELER, E., SCHWAB, M., LINZMEIER, R., FEATHERS, R. W., CHU, H., LIMA, H., JR., FELLERMANN, K., GANZ, T., STANGE, E. F. & BEVINS, C. L. 2005. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 102**,** 18129-34.
WEHKAMP, J. & STANGE, E. F. 2010. Paneth's disease. *J Crohns Colitis,* 4**,** 523-31.
WU, C. Y., DEMEURE, C., KINIWA, M., GATELY, M. & DELESPESSE, G. 1993. IL-12 induces the production of IFN-gamma by neonatal human CD4 T cells. *J Immunol,* 151**,** 1938-49.

YAMAZAKI, S., MUTA, T. & TAKESHIGE, K. 2001. A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. *J Biol Chem,* 276**,** 27657-62.
YASUDA, K., TAKEUCHI, Y. & HIROTA, K. 2019. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Semin Immunopathol,* 41**,** 283-297.
YATIM, K. M. & LAKKIS, F. G. 2015. A brief journey through the immune system. *Clin J Am Soc Nephrol,* 10**,** 1274-81.
ZAHRINGER, U., LINDNER, B. & RIETSCHEL, E. T. 1994. Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. *Adv Carbohydr Chem Biochem,* 50**,** 211-76.
ZIELINSKI, C. E., MELE, F., ASCHENBRENNER, D., JARROSSAY, D., RONCHI, F., GATTORNO, M., MONTICELLI, S., LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F. 2012. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature,* 484**,** 514-8.
ZIMMER, J., LANGE, B., FRICK, J. S., SAUER, H., ZIMMERMANN, K., SCHWIERTZ, A., RUSCH, K., KLOSTERHALFEN, S. & ENCK, P. 2012. A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *Eur J Clin Nutr,* 66**,** 53-60.

7 Erklärung zum Eigenanteil

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

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Julia-Stefanie Frick, Dr. rer. nat. Alexander Steimle (M. Sc.) und Dr. rer. nat. Lena Michaelis (M. Sc.).

Sämtliche Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Lena Michaelis durchgeführt. Der T-Zelltransfer auf gnotobiotische Rag1$^{-/-}$ erfolgte durch Lena Michaelis. Die Präparation der Tiere erfolgte teilweise mit Unterstützung durch Dr. Lena Michaelis, Dr. Alexander Steimle, Dr. Jan Maerz, Dr. Anna Lange, Raphael Parusel, Anne Grießhammer, Hans Yao und Andrea Schäfer. Die Analysen der qPCR und FACS wurden, nach Einarbeitung durch Dr. Lena Michaelis, von mir durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte, nach Anleitung durch Dr. Lena Michaelis und Dr. Jan Maerz, durch mich.

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

Baiersbronn, den 01.08.2024

…….

Hanna Fellmeth

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

> MICHAELIS, L., TRESS, M., LOW, H. C., KLEES, J., KLAMETH, C., LANGE, A., GRIESSHAMMER, A., SCHAFER, A., MENZ, S., STEIMLE, A., SCHULZE-OSTHOFF, K. & FRICK, J. S. 2020. Gut Commensal-Induced IkappaBzeta Expression in Dendritic Cells Influences the Th17 Response. *Front Immunol,* 11**,** 612336.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden aus oben genannter Publikation keine originalen Diagramme, keine Tabellen, keine Abbildungen sowie keine Zitate verwendet.

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei der Betreuerin meiner Arbeit, Frau Professorin Dr. Julia-Stefanie Frick bedanken. Vielen Dank für die Chance, in Deiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit absolvieren zu dürfen, für Deine Geduld, hilfreichen Ratschläge, Ideen und Deine Mühe.

Vielen Dank an meine Laborbetreuerin Dr. Lena Michaelis, welche mich in die Laborarbeit eingeführt hat, mir bei der Durchführung und Auswertung der Experimente mit Rat und Tat zur Seite stand, die Geduld und Zeit aufgebracht hat, meine Doktorarbeit mehrfach Korrektur zu lesen und für sämtliche Schwierigkeiten Lösungsvorschläge parat hatte. Vielen Dank, liebe Lena, für Deine wertvolle Unterstützung und Dein exzellentes Mentoring, ohne das meine Arbeit nie hätte stattfinden können.

Vielen Dank auch an Dr. Alexander Steimle, welcher gemeinsam mit Dr. Lena Michaelis die Idee für die Konzeption der Arbeit hatte und als erfahrener Mentor und Wissenschaftler immer für Fragen und Ratschläge zur Verfügung stand.

Herzlichen Dank an das Team des IZKF, welches meine Arbeit im Rahmen eines Promotionsstipendiums unterstützt hat.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich beim gesamten Team der Arbeitsgruppe bedanken. Danke an Euch alle, dir Ihr mir die Zeit bei Euch so unkompliziert, witzig und kurzweilig gemacht habt. Vielen Dank für den Spaß bei der Arbeit und Eure Unterstützung bei meiner Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich herzlich bei meinen engsten Freunden bedanken. Danke Julia, Katha, Lisa, Basti und Jonas für jedes gemeinsame Lachen, Aufmuntern bei Frustrationen, Motivieren und Zuhören, wenn was nicht so lief wie geplant. Und last but not least: Vielen lieben Dank an meinen Mann, an Dich, lieber Markus. Danke für Deine Unterstützung für mein Studium, meine Doktorarbeit, meinen Beruf und meine Träume. Danke, dass es Dich gibt und Du mich immer wieder neu ermutigt hast, diese Arbeit zu Ende zu bringen. Ohne Euch wäre ich nie so weit gekommen.