

**Differentielle Modulation dendritischer Zellen durch
kommensale Bakterien in IL-2-defizienten Mäusen**

der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von
Martina Müller
aus Karlsruhe

vorgelegte

D i s s e r t a t i o n

2008

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juni 2008

Dekan: Prof. Dr. H. Mallot

1. Berichterstatter: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Götz

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	4
1.1	Das Immunsystem.....	4
1.1.1	Unspezifische Abwehr.....	4
1.1.2	Spezifische Abwehr.....	5
1.1.3	Dendritische Zellen.....	9
1.2	Das Immunsystem des Darmes.....	12
1.2.1	Antigenaufnahme im Darm.....	14
1.2.2	Dendritische Zellen im Darm.....	15
1.2.3	Mikroflora.....	16
1.3	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED).....	17
1.3.1	Epidemiologie.....	18
1.3.2	Therapie.....	18
1.3.3	Etiologie.....	18
1.4	Tiermodelle zur Untersuchung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	21
1.4.1	IL-2-defizientes Mausmodell.....	23
1.4.2	<i>In vitro</i> Modell mit knochenmarksgereiften dendritischen Zellen.....	24
1.4.3	Verwendete Bakterien.....	25
1.5	Fragestellung.....	26
2	Material und Methoden.....	28
2.1	Mäuse.....	28
2.2	Expansion dendritischer Zellen mittels Flt3-Ligand <i>in vivo</i>	28
2.3	Isolation der Leukozyten aus den mesenterialen Lymphknoten und der Lamina propria.....	28
2.4	Zellkultur.....	29
2.4.1	Isolation knochenmarksgereifter dendritischer Zellen.....	29
2.4.2	Kultivierung von Bakterien.....	30
2.4.3	Stimulation knochenmarksgereifter dendritischer Zellen.....	30
2.4.4	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).....	31
2.4.5	Migrations-Assay.....	31
2.5	Analyse der mRNA Expression mittels quantitative real-time PCR.....	31
2.5.1	mRNA-Isolation aus knochenmarksgereiften DC und intestinalem Gewebe.....	31

2.5.2	cDNA-Synthese und PCR.....	32
2.6	Durchflusszytometer	34
2.6.1	Bestimmung der Zelloberflächenmarker	34
2.6.2	Intrazelluläre Zytokinfärbung in T-Zellen und dendritischen Zellen in der Lamina propria	36
2.7	Histopathologie und anti-CD11c Färbung	36
2.7.1	Histopathologie	36
2.7.2	Anti-CD11c Färbung.....	37
2.8	Statistik.....	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Charakterisierung dendritischer Zellen in der Lamina Propria.....	38
3.1.1	Expression der Aktivierungsmarker auf Lamina propria-dendritischen Zellen..	39
3.1.1.1	Expression von Aktivierungsmarkern auf CD11c ^{int} Zellen (R1)	40
3.1.1.2	Expression von Aktivierungsmarkern auf CD11c ^{hi} -Zellen (R2).....	41
3.1.2	Dendritische Zell-Subpopulationen in der Lamina propria	42
3.1.3	Lokalisierung dendritischer Zellen in der Lamina propria	44
3.1.4	Anzahl dendritischer Zellen in der Lamina propria	45
3.2	<i>B. vulgatus</i> differenziert dendritische Zellen in der Lamina propria zu einem semi- maturen Phänotyp.....	48
3.2.1	CCR7-Expression auf dendritischen Zellen in der Lamina propria und in den mesenterialen Lymphknoten.....	48
3.2.2	Charakterisierung dendritischer Zellen in den mesenterialen Lymphknoten	49
3.2.2.1	Expression der Aktivierungsmarker auf dendritischen Zellen in den mesenterialen Lymphknoten	50
3.2.2.2	Zellzahl und Subpopulationen dendritischer Zellen in den mesenterialen Lymphknoten.....	51
3.2.2.3	Lokalisierung dendritischer Zellen in den mesenterialen Lymphknoten	53
3.3	Untersuchung der T-Zellen in der Lamina propria	54
3.4	<i>B. vulgatus</i> induziert semi-mature Lamina propria-dendritische Zellen durch IL-6	55
3.4.1	CCR7-Expression auf <i>B. vulgatus</i> - oder <i>E. coli</i> -stimulierten DCs	56
3.4.2	Migration <i>B. vulgatus</i> - oder <i>E. coli</i> -stimulierter DCs	57
3.4.3	Responsivität <i>B. vulgatus</i> - oder <i>E. coli</i> -stimulierter DCs gegenüber LPS.....	58
3.5	IL-6-Expression dendritischer Zellen in der Lamina propria <i>B. vulgatus</i> -kolonisierter <i>IL-2^{-/-}</i> -Mäuse	60

4	Diskussion	64
4.1	Induktion semi-maturer DCs in der Lamina propria <i>B. vulgatus</i> -monokolonisierter <i>IL-2^{-/-}</i> -Mäuse	66
4.1.1	Expression von Aktivierungsmarkern auf Lamina propria-dendritischen Zellen in WT-Mäusen	68
4.1.2	DC-Subpopulationen in der Lamina propria.....	68
4.1.3	Charakterisierung der T-Zellen in der Lamina propria.....	70
4.2	Induktion semi-maturer dendritischer Zellen durch IL-6.....	71
4.2.1	Expansion dendritischer Zellen mittels Flt3-Liganden.....	72
4.2.2	Pro- und antiinflammatorische Wirkungen von IL-6.....	73
4.3	Reduziertes Migrationspotential semi-maturer dendritischer Zellen.....	75
4.3.1	Erhöhte Anzahl dendritischer Zellen in der Lamina propria <i>B. vulgatus</i> monokolonisierter <i>IL-2^{-/-}</i> -Mäuse	75
4.3.2	Anzahl dendritischer Zellen in den mesenterialen Lymphknoten	77
4.3.3	Expression der Aktivierungsmarker dendritischer Zellen in den mesenterialen Lymphknoten.....	79
4.3.4	CCR7-Expression dendritischer Zellen in der Lamina propria und in den mesenterialen Lymphknoten.....	80
4.4	Interaktion Lamina propria-dendritischer Zellen mit Bakterien	81
5	Zusammenfassung.....	83
6	Abkürzungen	85
7	Literaturverzeichnis.....	87
9	Danksagung.....	101
10	Lebenslauf.....	102
11	Publikationen.....	103

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Um sich vor dem Eindringen pathogener Mikroorganismen zu schützen, hat der Säugerorganismus im Laufe der Evolution verschiedene Abwehrmechanismen entwickelt, die zur effektiven und schnellen Elimination pathogener Mikroorganismen dienen. Diese Abwehrmechanismen werden in spezifische (adaptive) und unspezifische (angeborene) Immunität unterteilt. Unspezifische Antworten sind angeborene, schnell verfügbare und auf viele verschiedene Angreifer wirkende Mechanismen. Dagegen benötigt die adaptive Antwort eine gewisse Anlaufphase, wirkt dann aber sehr spezifisch, effektiv und führt zu einer lang anhaltenden Immunität (Fearon & Locksley 1996; Hoffmann *et al.* 1999; Medzhitov & Janeway, Jr. 1997).

1.1.1 Unspezifische Abwehr

Die unspezifische Abwehr wird auch als erste Verteidigungslinie gegen Mikroorganismen bezeichnet und ist auf Erreger im Allgemeinen ausgerichtet. Der Körper verfügt über mechanische, chemische und biologische Abwehrmechanismen. Eine erste mechanische Barriere bildet z.B. die Haut oder das Epithel des Verdauungstraktes, die durch chemische Mechanismen, wie z.B. die Salzsäure des Magens, antimikrobielle Peptide im Darm oder Enzyme ergänzt wird. Die biologische unspezifische Abwehr bedient sich zur Erkennung von Mikroorganismen Rezeptoren, die gegen allgemeine, konservierte molekulare Strukturen (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) auf Bakterien und Viren gerichtet sind (Didierlaurent *et al.* 2002; Philpott & Girardin 2004). Diese wirkungsvollen Erkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) befinden sich hauptsächlich auf Zelloberflächen, werden aber auch in intrazelluläre Kompartimente, in den Blutstrom oder in Gewebeflüssigkeiten sezerniert (Medzhitov & Janeway, Jr. 1997). Die Bindung der PRRs an PAMP-Strukturen führt zur Erkennung der eingedrungenen Mikroorganismen und zur Aktivierung des Immunsystems (Akira *et al.* 2006).

Unter PRRs nehmen Rezeptoren der Toll-like Familie (TLR) eine besondere Stellung ein. Sie erkennen verschiedene bakterielle Muster, darunter Lipopolysaccharide (LPS) (TLR4), Lipoproteine (TLR2), doppelsträngige DNA (TLR3), Flagellin (TLR5) und unmethylierte CpG DNA (TLR9), aber auch virale Muster, wie z.B. einzelsträngige DNA (TLR7) (Akira & Takeda 2004; Kawai & Akira 2005; Takeda *et al.* 2003). Dabei sind die TLRs 1, 2, 4, 5 und 6

auf Zelloberflächen exprimiert und erkennen hauptsächlich exogene, bakterielle Produkte, während die TLRs 3, 7, 8 und 9 intrazellulär angeordnet sind und auf die Erkennung intrazellulärer Erreger spezialisiert sind (Diebold *et al.* 2004; Heil *et al.* 2004; Matsumoto *et al.* 2003). Eine weitere wichtige Rezeptorfamilie, bildet die NLR-Familie (*nucleotide-binding domain and leucine-rich repeats*, NLR) im Zytosol von Immun- und Epithelzellen. Die am besten untersuchten Vertreter sind NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) 1 und NOD2. Sie erkennen verschiedene Muropeptid-Motive aus bakteriellen Glykopeptiden (Chamaillard *et al.* 2003; Girardin *et al.* 2003; Inohara & Nunez 2003; Philpott & Girardin 2004). Die Stimulierung der TLRs und NLRs führt über verschiedene Signalkaskaden unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004). Durch diesen Transkriptionsfaktor werden zahlreiche Immunantworten eingeleitet, wie z.B. die Bildung von Zytokinen (Botenstoffen) und die Expression kostimulatorischer Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen (APCs), die zur Aktivierung des spezifischen Immunsystems beitragen (Akira & Takeda 2004).

Die Eliminierung der Mikroorganismen findet in der unspezifischen Abwehr durch Phagozytose statt, die von Makrophagen, dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DCs) und neutrophilen Zellen (*polymorphonuclear leukocyte*, PMN) durchgeführt wird. Diese sogenannten Phagozyten wandern in Körpergeweben umher und können eingedrungene Mikroorganismen aufnehmen und lysieren. Obwohl Phagozyten über PRRs fähig sind Pathogene zu erkennen, werden sie häufig durch Opsonierung (Markierung) der Mikroorganismen zusätzlich aktiviert (Janeway *et al.* 2005). Die Opsonierung findet durch Antikörper oder das Komplementsystem statt. Die Aktivierung in den Phagozyten führt nicht nur zur vermehrten Aufnahme und Lyse der Erreger, sondern auch zur Sekretion von Zytokinen, die bestimmte pro- und antiinflammatorische Reaktionen im Körper hervorrufen. Proinflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-8, TNF- α und IL-12 fördern die Entstehung von Entzündungen und führen zur Mobilisierung des Immunsystems. Sie locken Immunzellen zum Infektionsherd und beschleunigen deren Migration in beschädigtes Gewebe. Dagegen regulieren und unterdrücken antiinflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-10, IL-4 und TGF- β Immunantworten, indem sie unter anderem die Bildung proinflammatorischer Zytokine supprimieren, oder regulatorische T-Zellen induzieren (Janeway *et al.* 2005).

1.1.2 Spezifische Abwehr

Im Laufe der Evolution haben Pathogene verschiedene Mechanismen entwickelt, um die unspezifische Abwehr zu umgehen und in den Wirtsorganismus einzudringen. Diese Erreger

werden mit Hilfe der spezifischen (adaptiven) Immunantwort bekämpft. Sie findet über B- und T-Zellen (sogenannten Lymphozyten) statt, die spezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen. Diese Rezeptoren sind gegen spezifische Antigene gerichtet, die für jeden Mikroorganismus charakteristisch sind. Dadurch ist eine hohe Spezifität gegen den jeweiligen Erreger gewährleistet. Vorteile dieses Systems sind: (i) die große Diversität der Rezeptoren durch genetische Rekombination, (ii) der Erinnerungs-Effekt nach bereits stattgefundenen Infektionen, (iii) die Selbstlimitierung und (iv) die Inhibition von Immunantwort gegen körpereigene Strukturen. Aktiviert wird das adaptive Immunsystem über antigenpräsentierende Zellen (APCs) der unspezifischen Abwehr. Zu den professionellen APCs zählen Makrophagen, DCs und B-Zellen. Sie nehmen Mikroorganismen oder mikrobielle Bestandteile auf, prozessieren deren Antigene und präsentieren diese über MHC (*major histocompatibility complex*)-Moleküle an Lymphozyten. APCs stellen somit ein wichtiges Bindeglied zwischen unspezifischer und adaptiver Abwehr dar. Die Antigenpräsentation durch APCs reicht allerdings zur Aktivierung des entsprechenden antigenspezifischen Lymphozyten nicht aus. Es wird noch ein zusätzliches Signal über kostimulatorische Moleküle benötigt. In APCs werden kostimulatorische Moleküle durch Gefahrensignale (*danger signals*) wie z.B. proinflammatorische Zytokine induziert (Matzinger 1994). Durch diesen zweiten Stimulus werden die Lymphozyten aktiviert, proliferieren und differenzieren zu Effektorzellen. Erfährt der Lymphozyt dieses zweite Signal nicht, wird keine Immunreaktion gegen das Antigen induziert (= Anergie). Der Lymphozyt befindet sich dauerhaft in diesem anergischen Zustand. Dieser Mechanismus schützt vor der Induktion einer Immunantwort gegen körpereigene Proteine.

T-Zellen werden ursprünglich im Knochenmark gebildet und reifen anschließend im Thymus fast vollständig aus. Man unterscheidet in $CD8^+$ -zytotoxische T-Zellen (CTLs) und in $CD4^+$ -T-Helferzellen (Th).

Zytotoxische T-Zellen (CTLs) dienen der Abwehr von Viren und anderer intrazellulärer Mikroorganismen. APCs präsentieren Antigene über MHC-Klasse-I (MHC-I) Moleküle an CTLs. Bei passendem T-Zell-Rezeptor und der Expression kostimulatorischer Moleküle antigenpräsentierender Zellen (APCs) werden CTLs aktiviert und können infizierte Wirtszellen töten, sowie proteolytische Enzyme produzieren, die in infizierten Zellen Apoptose induzieren. Dadurch wird die Vermehrung intrazellulärer Viren und Bakterien verhindert. Nach dem Absterben der Zelle werden freigesetzte Mikroorganismen durch Phagozyten aufgenommen (Andersen *et al.* 2006).

CD4⁺-T-Helferzellen (Th) unterstützen die effektive Beseitigung extrazellulärer Mikroorganismen. Hier findet die Antigenpräsentation der APCs über MHC-Klasse-II (MHC-II) Moleküle statt. Vergleichbar mit CTLs werden auch CD4⁺-T-Zellen nur bei passendem Antigen-Rezeptor-Komplex und der Expression kostimulatorischer Moleküle antigenpräsentierender Zellen (APCs) aktiviert und differenzieren zu Th1- oder Th2-Zellen (Abb. 1). Th1-Zellen produzieren vermehrt IFN- γ und stimulieren dadurch Makrophagen, die vermehrt Mikroorganismen phagozytieren und lysieren (= zelluläre Abwehr). Th2-Zellen produzieren dagegen IL-4, IL-5 und IL-13. Dies führt zur Aktivierung von B-Zellen, die infolgedessen vermehrt Antikörper produzieren (= humorale Abwehr).

Die Differenzierung der T-Zellen in Th1 bzw. Th2 wird durch APCs, insbesondere DCs gesteuert (Abb. 1). DCs bilden je nach aufgenommenem Mikroorganismus ein bestimmtes Zytokinmilieu, das die zur Eliminierung notwendige Th-Antwort in T-Zellen induziert (de Jong *et al.* 2002). Durch die Produktion antigenpräsentierender DCs von IL-12 und IFN- γ werden Th1-Zellen induziert. Dagegen führt die Sekretion antigenpräsentierender DCs von IL-4 und IL-10 zu einer Th2-Antwort (Abbas *et al.* 1996; Ho & Glimcher 2002). Neben dominierenden Zytokinen wird die T-Zell-Polarisierung auch durch die Bindungsstärke des MHC-II-TCR-Komplexes zwischen antigenpräsentierender und T-Zelle beeinflusst. Eine starke Bindung führt eher zu einer Th1-Antwort (Kaiko *et al.* 2008). In einem gesunden Organismus besteht ein Gleichgewicht zwischen beiden Th-Antworten, das unter anderem von regulatorischen T-Zellen gesteuert wird. Bei chronischen Autoimmunerkrankungen liegt meistens eine überschießende Th1-Antwort vor, während bei allergischen Reaktionen eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung Th2 zu beobachten ist (Murphy *et al.* 2000; Neurath *et al.* 2002).

Neuerdings wurde in Mausmodellen mit Autoimmunerkrankungen wie z.B. der experimentellen Autoimmunenzephalitis eine weitere T-Helferzelle entdeckt, die hauptsächlich IL-17 und IL-23 produziert (Aggarwal *et al.* 2003; Weaver *et al.* 2006). Initiiert wird die Th17-Zelle in der Maus durch IL-6 und TGF- β (Bettelli *et al.* 2006; Mangan *et al.* 2006). Es ist noch unklar, ob es sich dabei um eine eigene Zelllinie handelt (Harrington *et al.* 2005; Ivanov *et al.* 2006; Park *et al.* 2005), oder ob sich Th17-Zellen aus einer Th1-Antwort entwickeln (Mathur *et al.* 2006). Die Rolle der Th17-Zellen in der Wirtsabwehr ist bis jetzt noch nicht vollständig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass IL-17 die Generierung und Mobilisierung von Neutrophilen stimuliert (Fossiez *et al.* 1998) und außerdem bei der Abwehr extrazellulärer Bakterien eine bedeutende Rolle spielt (Stockinger & Veldhoen 2007).

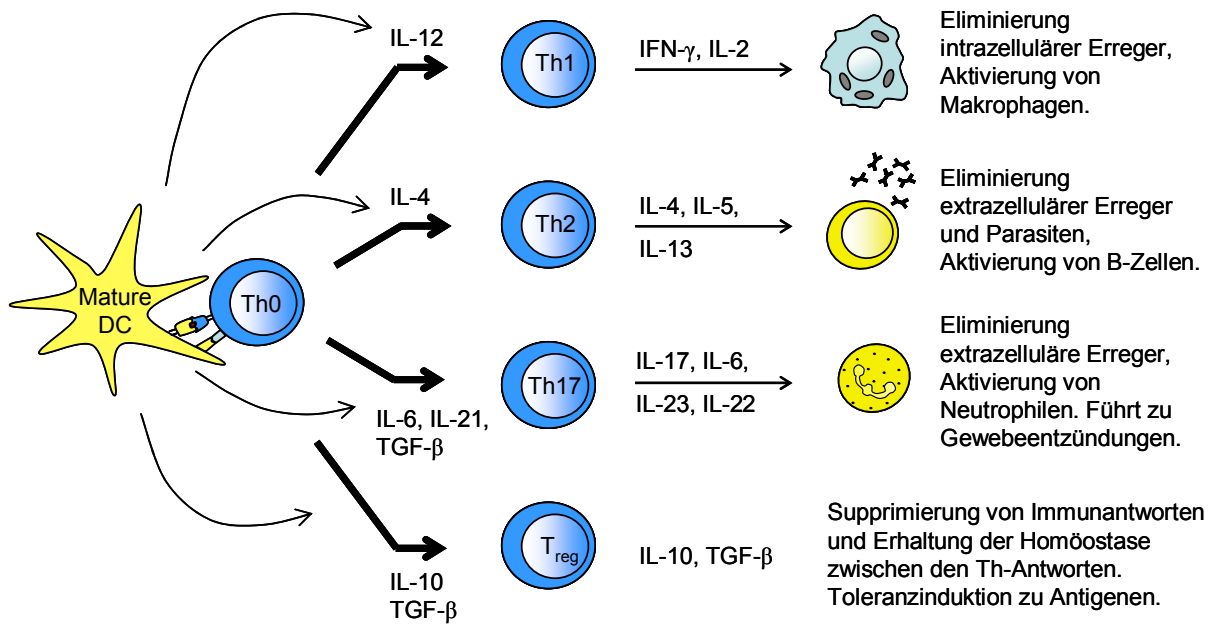


Abb. 1: Schematische Darstellung der Polarisation naiver CD4⁺-T-Zellen und die Funktionen der Th-Effektorzellen. Th0: naive T-Zelle; TGF- β : transforming growth factor- β

Eine weitere Untergruppe der T-Zellen sind **regulatorische T-Zellen** (T_{reg}). Sie supprimieren die Aktivierung des Immunsystems und erhalten so die Homöostase des Abwehrsystems und die Toleranz zu Selbst-Antigenen. Anhand von Experimenten werden T_{reg} hypothetisch in natürlich auftretende und induzierte T_{reg} eingeteilt (Mittrucker & Kaufmann 2004).

Natürliche T_{reg} differenzieren aus CD4⁺-T-Zellen im Thymus zu regulatorischen T-Zellen. Als spezifischer Marker dieser Zellen wird der Transkriptionsfaktor Foxp3 (*forkhead box P3*) verwendet (Ramsdell 2003), der von essenzieller Bedeutung für die Entwicklung und Funktion der T_{reg} ist (Zheng & Rudensky 2007). Mutationen im Foxp3-Gen führen sowohl in der Maus, wie auch im Menschen zu einer tödlichen Autoimmunkrankheit, die beim Menschen als X-linked immunodeficiency syndrome (IPEX) bekannt ist (Brunkow *et al.* 2001; Powell *et al.* 1982). Neben Foxp3 wurden noch weitere Oberflächenmarker auf regulatorischen T-Zellen entdeckt, wie z.B. CD25, CD152 (CTLA-4), CD103 (α E-Integrin) oder CD134 (OX40), die eventuell weitere Subpopulationen der T_{reg} charakterisieren. Natürlich auftretende T_{reg} sind wahrscheinlich für die Suppression von Immunantworten gegen Selbst-Antigene verantwortlich (Schwartz 2005) und unterdrücken hauptsächlich APCs, aber auch Effektor-T-Zellen und weitere Komponenten des angeborenen

Immunsystems. Der Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig verstanden (Bluestone & Abbas 2003; Sakaguchi 2005). *In vitro* Experimente weisen auf einen direkten Zell-Zell-Kontakt hin (Shevach 2002), während *in vivo* die Supprimierung durch IL-10 und TGF- β gezeigt werden konnte (Huber *et al.* 2004; von 2005).

Im Gegensatz zu natürlich auftretenden T_{reg} werden induzierte T_{reg} aus $CD4^+CD25^-$ -T-Zellen gebildet (Apostolou & von 2004). Für die Induktion dieser Zellen scheinen vor allem TGF- β und/oder IL-10 eine wichtige Rolle zu spielen (Chen *et al.* 2003; Schramm *et al.* 2004). Diese Zytokine führen vermutlich zur Induktion von Foxp3 in $CD4^+CD25^-$ -T-Zellen, die dadurch zu $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ -T-Zellen konvertiert werden. Auch hier können, wie bei natürlichen T_{reg} , zusätzliche Oberflächenmarker exprimiert werden. Es wird vermutet, dass induzierte T_{reg} durch die Produktion von IL-10 und/oder TGF- β für die Supprimierung von Immunantworten gegen Fremd- und Selbst-Antigene verantwortlich sind (Bluestone & Abbas 2003).

B-Zellen werden im Knochenmark gebildet. Die spezifischen Rezeptoren der B-Zellen sind auf der Zelloberfläche als Immunglobuline (Ig) angebracht und erkennen Antigene in ihrer löslichen Form. Dies steht im Gegensatz zu T-Zellen, die nur prozessierte Antigene über MHC-Moleküle erkennen können. Naive B-Zellen werden hauptsächlich T-Zell-abhängig aktiviert. Sie benötigen zur Aktivierung ein zusätzliches Signal von Th2-Zellen, die für das gleiche Antigen receptorspezifisch sind. Durch dieses zweite Signal formt sich die B-Zelle in eine Plasma- oder Gedächtniszelle um und sezerniert Antikörper, die gegen das spezifische Antigen gerichtet sind. Einige Antigene, wie z.B. bestimmte Polysaccharide, induzieren eine T-Zell-unabhängige Aktivierung der B-Zellen, die zwar zur Bildung von Antikörperproduzierenden Plasmazellen, aber nicht zur Bildung von B-Gedächtniszellen führt (Janeway *et al.* 2005).

Die sezernierten Antikörper der Plasmazellen wirken gegen extrazelluläre Erreger, neutralisieren Toxine, opsonieren Bakterien, aktivieren das Komplementsystem und verhindern die Adhäsion und Invasion der Mikroorganismen an bzw. in Wirtszellen.

1.1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) erfüllen als wichtigste antigenpräsentierende Zelle (APCs) die zentrale Funktion der Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Sie entwickeln sich aus hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark, zirkulieren als Vorläufer-DCs in Blut und Lymphe und wandern in peripheres Gewebe. Dort nehmen sie als immature DCs mit hoher phagozytischer Kapazität Antigene auf. Nach Antigenaufnahme wandern die

aktivierten DCs in die sekundären Lymphorgane und aktivieren dort, durch die Präsentation des Antigens und der Expression kostimulatorischer Moleküle, naive T-Zellen (Banchereau *et al.* 2000; Banchereau & Steinman 1998; Huang & MacPherson 2001; Lanzavecchia & Sallusto 2001; Pulendran *et al.* 2001). Neben der Antigenpräsentation und der Aktivierung von T-Zellen (Cella *et al.* 1997) induzieren DCs durch die Präsentation körpereigener Antigene auch Toleranz in T-Zellen (Steinman & Nussenzweig 2002; Steinman *et al.* 2003). Außerdem tragen DCs durch Stimulation der T-Zell-Rezeptoren zur Erhaltung von naiven und T-Gedächtnis-Zellen bei (Brocker 1997; Ridge *et al.* 1998).

Die **Aufnahme von Antigenen** durch DCs findet über Endozytose (Sallusto & Lanzavecchia 1994; Sallusto *et al.* 1995), Phagozytose (Inaba *et al.* 1993; Moll *et al.* 1993) und Pinozytose (Sallusto *et al.* 1995) statt. Durch die rezeptorinduzierte Endozytose und Phagozytose werden makromolekulare Bestandteile über die Plasmamembran aufgenommen. Für die Endozytose exprimieren immature DCs verschiedene Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, unter anderem Fc-Rezeptoren (FcR) für Immunglobuline (Esposito-Farese *et al.* 1995; Fanger *et al.* 1996), Komplementrezeptoren CR3 und CR4 (Reis e Sousa & Austyn 1993), Rezeptoren für Hitzeschockproteine (Binder *et al.* 2000; Arnold-Schild *et al.* 1999) und Scavenger-Rezeptoren (Platt & Gordon 1998). Die Liganden der Scavenger-Rezeptoren sind hauptsächlich bakterielle Lipoproteine, sie können aber auch apoptotische Zellen binden (Nakamura *et al.* 2001; Platt *et al.* 1998). Mono- und Oligosaccharide können durch C-Typ Lektine, wie z.B. den Makrophagen-Mannose-Rezeptor (Nakamura *et al.* 2001; Sallusto *et al.* 1995) oder DEC205 (Jiang *et al.* 1995) gebunden werden. Die Makropinozytose, bei der DCs große Mengen extrazellulärer Flüssigkeit in ihre Vesikel aufnehmen, erfolgt rezeptorunabhängig. Die Pinozytose erlaubt eine konstante, schnelle und unspezifische Aufnahme von Antigenen, die in der umgebenen Flüssigkeit enthalten sind (Sallusto *et al.* 1995). Mit der Antigenaufnahme beginnt ein kontinuierlicher Reifungsprozess dendritischer Zellen. Neben Bestandteilen von Mikroorganismen können auch körpereigene immunologische Mechanismen die Reifung dendritischer Zellen induzieren (Medzhitov & Janeway, Jr. 1997; Regnault *et al.* 1999). Diese immunologischen Mechanismen umfassen die lokale Sekretion proinflammatorischer Zytokine (Aliberti *et al.* 2000; Reis e Sousa 2001), die Aufnahme von Immunkomplexen über Fc-Rezeptoren oder die Aufnahme von Bestandteilen sterbender Zellen.

Zu Beginn des **Reifungsprozesses** sezernieren DCs proinflammatorische Zytokine, die andere immunkompetente Zellen anlocken. Die Endozytose- und Phagozytose-Aktivität nimmt während des Reifungsprozesses durch Aufnahme der Rezeptoren in das Zellinnere ab

(Thery & Amigorena 2001; West *et al.* 2004). Zusätzlich werden Oberflächenrezeptoren, wie z.B. Chemokin-Rezeptor (CCR) 1, CCR2, CCR5 und CCR6, die unreife DCs zu Entzündungsorten im Organismus leiten, weniger exprimiert (Sallusto *et al.* 1998). Dadurch, sowie durch die Expression des Chemokin-Rezeptors 7 (CCR7), der für die Migration dendritischer Zellen in die mesenterialen Lymphknoten verantwortlich ist, verlassen DCs das entzündete Gewebe und migrieren in das lymphatische Gewebe. CCR7 bindet an die beiden Chemokin-Liganden (CCL) 19 und CCL21. Durch die Produktion von CCL21 im lymphatischen Endothel (Banchereau & Steinman 1998; Sallusto *et al.* 1998) und die CCL19-Produktion in den T-Zell-Zonen der sekundären Lymphorgane (Baekkevold *et al.* 2001) wird die Migration dendritischer Zellen in die mesenterialen Lymphknoten gesteuert. CCL19 lockt neben DCs auch naive T-Zellen an.

Weitere Schritte im Reifungs- und Maturationsprozess dendritischer Zellen sind die **Prozessierung und Präsentation** der Antigene über MHC-Moleküle. Intrazelluläre Antigene werden im Zytosol von Proteasomen (= multikatalytische Proteasen) abgebaut und über MHC-Klasse-I präsentiert, während extrazelluläre Antigene durch Proteasen in angesäuerten Endosomen gespalten und über MHC-Klasse-II an die Zelloberfläche transportiert werden. Nach der Migration in die lymphatischen Organe präsentieren DCs die aufgenommenen und prozessierten Antigene an Lymphozyten. Dabei exprimieren DCs Adhäsionsmoleküle, wie β 1- und β 2-Integrine und Mitglieder der Immunglobulinfamilie, zu denen unter anderen CD2, CD54 (ICAM1), CD50 (ICAM3) und CD58 (LFA-3) zählen, die es T-Zellen ermöglichen an antigenpräsentierende DCs zu binden. Die Zell-Zell-Interaktion wird zusätzlich durch ein Chemokin (DC-CK1) unterstützt, das von DCs sezerniert wird und speziell T-Zellen anlockt (Adema *et al.* 1997). Die Ausbildung von Dendriten vergrößert die Oberfläche dendritischer Zellen und ermöglicht die gleichzeitige Präsentation des Antigens an mehrere Lymphozyten. Zur **Aktivierung der T-Zelle** müssen DCs noch zusätzlich kostimulatorische Moleküle exprimieren, wie z.B. CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), die mit CD28 bzw. CD152 (CTLA-4) auf T-Zellen interagieren. Auch CD40 dient als kostimulatorisches Molekül, das an CD40 Liganden auf T-Zellen bindet. Neben der Aktivierung von T-Zellen führt die Bindung des CD40 Liganden auch zur vermehrten Bildung von B7-Molekülen auf DCs, wodurch die T-Zell-Proliferation weiter angeregt wird (Grewal & Flavell 1998). Ist es DCs möglich T-Zellen zu aktivieren, haben sie ihren Reifungsprozess abgeschlossen und werden als mature DCs bezeichnet.

Ein besonderes Merkmal der DC-Familie ist die außergewöhnlich **heterogene Zellpopulation**, die wahrscheinlich auf unterschiedliche Entwicklungen der Vorläufer-DCs

und auf verschiedene Lokalisierungen im Gewebe zurückzuführen ist. Zur DC-Familie gehören unter anderem die epidermalen Langerhans-Zellen, die interstitiellen DCs in den verschiedenen Organen, die DCs in den T-Zell-reichen Gebieten der Lymphgewebe, sowie die DCs im Thymus (Banchereau & Steinman 1998).

Im murinen System gilt CD11c als gemeinsames charakteristisches Merkmal der DCs. Je nach exprimierten Oberflächenmolekülen werden weitere **DC-Subpopulationen** unterschieden. Eine erste Einteilung findet zwischen myeloiden (mDCs) und plasmazytoiden (pDCs) DCs statt. Myeloide DCs exprimieren neben CD11c auch CD11b und beinhalten migratorische wie auch Lymphgewebe-resistente DCs (Shortman & Naik 2007). Plasmazytoide DCs sind durch die zusätzliche Expression von B220 gekennzeichnet und produzieren nach viralen oder anderen mikrobiellen Infektionen große Mengen an Typ-I Interferonen. Diese Interferone verhindern die virale Replikation und aktivieren andere Immunzellen, weshalb pDCs eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von Viren zufällt (Liu 2005; O'Keefe *et al.* 2002; Yoneyama *et al.* 2004). Im murinen System werden noch weitere Subpopulationen durch die Expression von CD11b, CD8 und CD4 unterschieden (Ardavin 2003; Kelsall & Leon 2005; Shortman & Naik 2007). Von einer Einteilung bezüglich des myeloiden und lymphoiden Ursprungs dendritischer Zellen wird mittlerweile Abstand genommen. Es konnte gezeigt werden, dass sich alle DC-Subpopulationen aus beiden Vorläuferzellen entwickeln können (Chicha *et al.* 2004; Manz *et al.* 2001; Shigematsu *et al.* 2004; Traver *et al.* 2000; Wu *et al.* 2001). Die Entwicklung der Vorläuferzellen hängt vielmehr von der Expression des Flt3 (*FMS-like tyrosin kinase 3*) –Rezeptors ab (D'Amico & Wu 2003; Karsunky *et al.* 2003; Karsunky *et al.* 2005).

1.2 Das Immunsystem des Darmes

Der Darm, mit seiner Oberfläche von 200-300 m², bietet Mikroorganismen einen riesigen Lebensraum. Eine besondere Aufgabe des Gastrointestinaltraktes besteht neben der Resorption von Wasser und Nährstoffen in der Abwehr von Pathogenen. Erstaunlicherweise ist es dem Darmimmunsystem möglich kommensale Mikroorganismen zu tolerieren, während es gleichzeitig Pathogene eliminiert.

Die erste **unspezifische Immunantwort** des Darmes, die das Eindringen von Bakterien verhindert, ist die Epithelbarriere und der durch Becherzellen produzierte Mukus. Panethsche Zellen, die in den Krypten zwischen den Epithelzellen angesiedelt sind, sezernieren zusätzlich antimikrobielle Peptide (z.B. Defensine) und Enzyme, die sich im Mukus anreichern und wirkungsvoll Bakterien abtöten. In der Schleimschicht befindet sich außerdem

Immunglobulin (Ig) A, das von B-Zellen (so genannte B-1 Zellen) in der Lamina propria sekretiert und durch Transzytose der Epithelzellen in das Lumen abgegeben wird. Die sezernierten Immunglobuline binden an Darmpathogene und deren toxische Produkte und führen zur Opsonierung der Mikroorganismen, bzw. zur Neutralisierung von Toxinen. Die Besonderheit der IgA-Produktion ist die T-Zell-unabhängige Sekretion und die geringe Diversität dieser Rezeptoren. Die Immunreaktion wird daher eher der angeborenen als der adaptiven Abwehr zugerechnet (Fagarasan & Honjo 2000; Macpherson *et al.* 2000). Eine weitere Ausnahme des adaptiven Immunsystems bilden die im Darmepithel angesiedelten, meist CD8⁺, intraepithelialen T-Zellen (IEL). Das Auffallende der IEL ist der hohe Anteil an T-Zellen, die einen $\gamma:\delta$ T-Zellrezeptor anstelle des sonst üblichen $\alpha:\beta$ -Rezeptors tragen. Die genaue Funktion dieser T-Zellen ist noch nicht bekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass $\gamma:\delta$ T-Zellrezeptoren weniger antigenspezifisch wirken und durch Liganden aus infizierten Epithelzellen aktiviert werden (Hayday 2000).

Besonders gut ausgebildet ist das **adaptive Immunsystem** des Darmes, das so genannte GALT (*gut associated lymphoid tissue*) (Abb. 1). Neben organisierten Strukturen, wie z.B. die Peyerschen Plaques des Dünndarms, die Lymphfollikel des Kolons, sowie die mesenterialen Lymphknoten umfasst das GALT auch die diffus verteilten Immunzellen in der Lamina propria. Die organisierten Strukturen des GALTs zeigen einen ähnlichen Grundaufbau, der sich in T- und B-Zell-Regionen gliedert. Durch diesen Aufbau ist eine effektive Präsentation von Antigenen durch APCs an naive T-Zellen möglich.

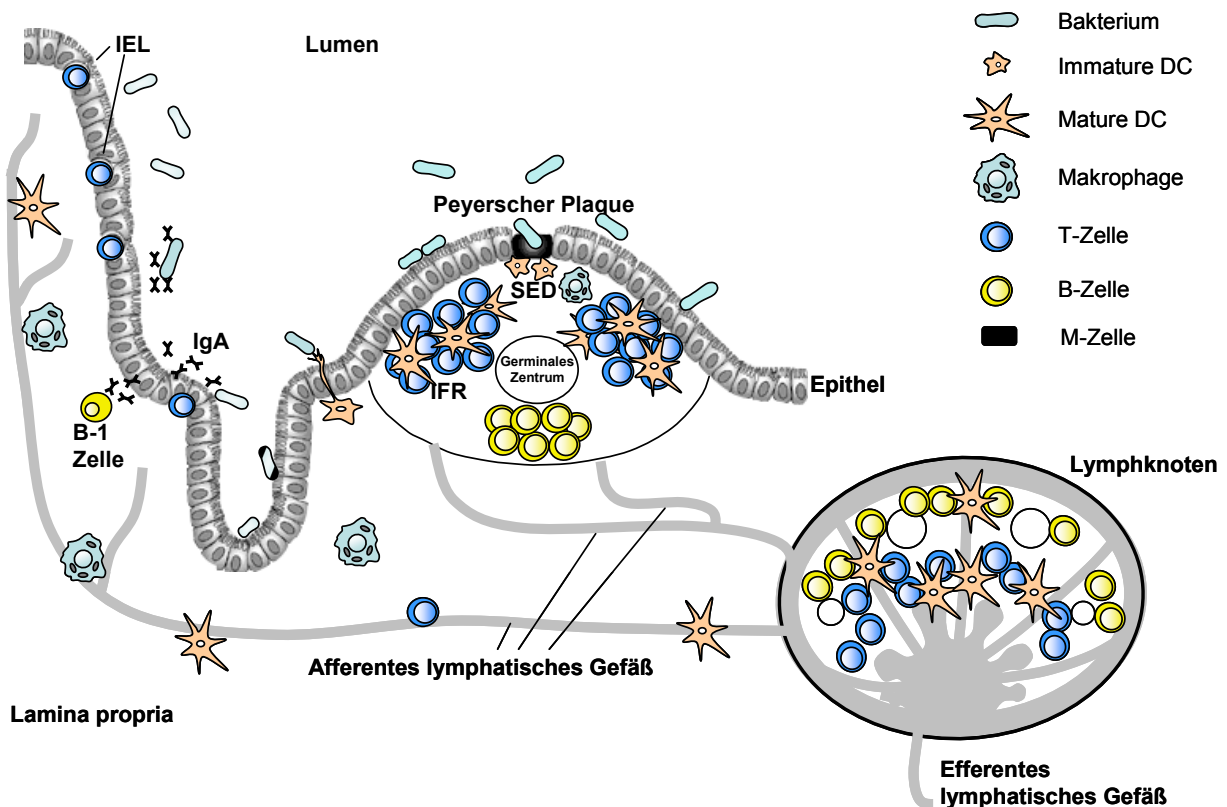


Abb. 2: Schematische Darstellung des Darmimmunsystems. Peyersche Plaques und mesenteriale Lymphknoten bilden die organisierten Lymphorgane, in denen die Induktion von Immunantworten stattfindet. Die Beseitigung der Mikroorganismen findet in der Lamina propria und im Epithel statt. Die Lamina propria und Peyerschen Plaques (PP) werden von afferenten lymphatischen Gefäßen durchlaufen, die zu den Lymphknoten führen. IEL: Intraepitheliale Lymphozyten, IFR: intrafollikuläre Region, IgA: Immunglobulin A, SED: subepithelialer Dom. Verändert nach Mowat *et al.* (Mowat 2003).

1.2.1 Antigenaufnahme im Darm

Die Antigenaufnahme findet hauptsächlich in den Peyerschen Plaques über spezialisierte Epithelzellen, den so genannten Microfold-(M) Zellen statt, die für Antigene passierbar sind. Unterhalb der M-Zellen nehmen APCs das Antigen auf und wandern zur Präsentation in die darunter liegenden T- und B-Zell-Regionen der Peyerschen Plaques (Abb. 1). Mikroorganismen, die über Verletzungen der epithelialen Barriere eingedrungen sind, werden von APCs in der Lamina propria aufgenommen und entweder intraepithelialen Lymphozyten (IEL) im Epithel oder, nach Migration in die mesenterialen Lymphknoten, naiven T-Zellen präsentiert. Lösliche Antigene im Lumen können auch über Rezeptoren auf Epithelzellen (z.B. dem „neonatalen“ Fc-Rezeptor für IgG) aufgenommen und vom Lumen in die Lamina propria transportiert werden (Israel *et al.* 1997). DCs besitzen einen weiteren Mechanismus zur luminalen Antigenaufnahme, indem sie Dendriten bilden, die sie zwischen Epithelzellen in das Lumen strecken (Niess *et al.* 2005; Rescigno *et al.* 2001).

1.2.2 Dendritische Zellen im Darm

Aufgrund der hohen Dichte an Mikroorganismen im Darmlumen besitzen DCs des GALTs im Vergleich zu nichtmukosalen DCs besondere Eigenschaften, die überschießende Immunantworten verhindern und das Immunsystem des Darmes im Gleichgewicht halten.

- (1) Mukosale DCs produzieren als Antwort auf mikrobielle Produkte hauptsächlich antiinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-10 und TGF- β (Iwasaki & Kelsall 2001; Sato *et al.* 2003). Diese Konditionierung der mukosalen DCs wird vermutlich durch Epithelzellen, die bestimmte Faktoren wie z.B. TSLP (*thymic stromal-derived lymphopoietin*) produzieren, beeinflusst (Rimoldi *et al.* 2005).
- (2) Mukosale DCs polarisieren T-Zellen eher in Richtung Th2 oder induzieren regulatorische T-Zellen (Everson *et al.* 1996; Iwasaki & Kelsall 1999).
- (3) DCs des GALTs aktivieren B-1-Zellen, die infolgedessen Antikörper des Isotyps IgA produzieren. IgA wirkt an Körperoberflächen, auf denen es die Anlagerung von Bakterien oder Toxinen an Epithelzellen verhindert (Mora *et al.* 2006; Shikina *et al.* 2004).
- (4) Außerdem aktivieren mukosale DCs naive CD8⁺-T-Zellen und induzieren auf deren Oberfläche die Expression von Chemokin-Rezeptor 9 (CCR9) und Integrin ($\alpha_4\beta_7$). Beide Oberflächenmoleküle führen zu einer schnellen Migration der T-Zellen in entzündete Areale der Lamina propria. (Johansson-Lindbom *et al.* 2003; Mora *et al.* 2003; Stagg *et al.* 2002).

Trotz dieser speziellen Eigenschaften mukosaler DCs ist bislang noch nicht vollständig geklärt, wie das Darmimmunsystem zwischen Pathogenen und Kommensalen unterscheidet. Nach neuesten Erkenntnissen erhalten DCs nach Kontakt mit Pathogenen noch ein zweites inflammatorisches Signal über infizierte Epithelzellen. Dieses zweite Signal, das bei Kontakt mit Kommensalen nicht induziert wird, führt zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und zur vollständigen Aktivierung der DCs. Durch die Aktivierung mukosaler DCs findet im weiteren Verlauf eine Aktivierung und Polarisierung der T-Zellen statt (Iwasaki 2007; Kelsall & Leon 2005; Rakoff-Nahoum *et al.* 2004; Rescigno & Chieppa 2005; Sato & Iwasaki 2004).

DC-Subpopulationen im Darm

In Peyerschen Plaques, mesenterialen Lymphknoten und in der Lamina propria finden sich ähnliche DC-Subpopulationen, die sich in ihrer prozentualen Verteilung unterscheiden (Tab. 1) (Iwasaki 2007; Johansson & Kelsall 2005; Kelsall & Leon 2005).

Tab. 1: Murine DC-Subpopulationen, Lokalisierung und Funktionen in Peyerschen Plaques (PP), mesenterialen Lymphknoten (mLK) und Lamina propria (LP). IFR: interfollikuläre Region, SED: subepithelialer Dom, FAE: follikuläres-assoziertes Epithel. Verändert nach (Johansson & Kelsall 2005).

Subpopulationen	Lokalisierung	Funktion
CD11c⁺ CD11b⁻ CD4⁻ CD8α⁺	PP: IFR mLK: ? LP: ?	PP: Produzieren viel IL-12, wenig IL-10; präsentieren Antigene des Reovirus an CD4 ⁺ -T-Zellen. mLK: Produzieren viel IL-12. LP: ?
CD11c⁺ CD11b⁺ CD4⁻ CD8α⁻	PP: SED mLK: ? LP: verteilt	PP: Produzieren viel IL-10, wenig IL-12 (Iwasaki & Kelsall 1999); induzieren IL-10-produzierende T _{reg} -Zellen, sowie T-Zellen, die B-Zellen zur IgA-Produktion aktivieren (Sato <i>et al.</i> 2003). mLK: ? LP: Akkumulieren in entzündeten Arealen (Karlis <i>et al.</i> 2004). Nehmen Bakterien im terminalen Ileum auf, u.a. auch durch intraepitheliale Dendriten (Niess <i>et al.</i> 2005).
CD11c⁺ CD11b⁻ CD4⁻ CD8α⁻	PP: FAE, SED, IFR, B-Zell-Follikel mLK: ? LP: verteilt	PP: Produzieren viel IL-12, wenig IL-10 (Iwasaki & Kelsall 1999); nehmen Reovirus-infizierte apoptotische Epithelzellen im SED auf. Präsentieren Antigene des Reovirus an CD4 ⁺ -T-Zellen. mLK: ? LP: Exprimieren IL-23 im nicht-entzündlichen Zustand. Antigenaufnahme im terminalen Ileum (Becker <i>et al.</i> 2003).
CD11c^{int} CD11b⁻ B220⁺ CD8α^{-/+}	PP: SED, IFR mLK: T-Zell-Zonen LP: ?	PP/mLK: Produzieren IFN-α. Schwache Stimulatoren von Antigen-spezifischen T-Zellen. Induzieren IL-10-produzierende T _{reg} -Zellen LP: Akkumulieren in entzündeten Arealen (Karlis <i>et al.</i> 2004).

1.2.3 Mikroflora

Der menschliche Gastrointestinaltrakt wird von ungefähr 10^{13} - 10^{14} Mikroorganismen besiedelt, wobei Eubakterien den größten Anteil bilden (Guarner & Malagelada 2003; Sears 2005; Steinhoff 2005). Trotz dieser hohen Dichte an Bakterien zeigt sich erstaunlicherweise eine geringe Diversität der Bakterienstämme (hauptsächlich *Bacteroidetes* und *Firmicutes*), unter denen die Gattungen *Bacteroidales*, *Bifidobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridiales* und *Lactobacillales* dominieren (Backhed *et al.* 2005; Sears 2005). Mehr als 90 % der Darmflora sind obligate Anaerobier. Die Bakteriendichte nimmt vom Magen zum Dickdarm

konstant zu und beträgt im Kolon etwa 10^{10} - 10^{12} Bakterien pro Gramm. In den ersten Lebensjahren entwickelt jeder Mensch durch Selektionsdruck des Darmtraktes eine spezifische Zusammensetzung an Mikroorganismen (Zoetendal *et al.* 1998). Diese spezifische Darmflora kann sich im Laufe des Lebens durch Diäten, kulturelle Begebenheiten, Alter und Antibiotika-Einnahme verändern (Berg 1996; Bocci 1992).

Die natürliche Darmflora bringt dem Wirt einige Vorteile. Sie baut für den Körper unverdauliche Bestandteile der Nahrung ab und versorgt ihn mit Energie (Guarner & Malagelada 2003; Sears 2005). Sie erschwert die Kolonisierung durch pathogene Mikroorganismen (Goldin 1998), stimuliert die Entwicklung des Immunsystems (Rhee *et al.* 2004) und regt die Peristaltik des Darmes an. Des Weiteren ist die Darmflora durch den Abbau kanzerogener Stoffe an der Entgiftung und an der Versorgung des Wirtes mit Vitamin K- und Vitamin B-Komplexen beteiligt (Berg 1996; Hill 1997).

Zum Erhalt der natürlichen Darmflora, bei gleichzeitiger Abwehr enteropathogener Bakterien stehen dem Immunsystem komplexe regulatorische Mechanismen zur Verfügung. Dysregulationen des Immunsystems können zu überschießenden Immunantworten führen und Autoimmunerkrankungen hervorrufen. Ein Beispiel dafür sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen.

1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind meist in Schüben verlaufende, entzündliche Erkrankungen des Darmes, die bisher nicht heilbar sind. Die bekanntesten Vertreter sind Morbus Crohn und Kolitis ulzerosa, die anhand der auftretenden Krankheitsbilder unterschieden werden. Bei Morbus Crohn kann die Entzündung im gesamten Magen-Darm-Trakt auftreten. Bevorzugt befallen sind jedoch der untere Dünndarm (terminales Ileum), sowie der Beginn des Dickdarmes. Charakterisierend für Morbus Crohn ist der diskontinuierliche, segmentale Befall, der alle Schichten der Darmwand betreffen kann. Im Gegensatz zum Morbus Crohn ist die Entzündung der Kolitis ulzerosa auf den Dickdarm begrenzt. Meistens beginnt die Erkrankung im Rektum und breitet sich im weiteren Verlauf unterschiedlich weit in Richtung des proximalen Dickdarms aus. Die entzündlichen Prozesse der Kolitis ulzerosa sind auf die Darmschleimhaut (Mukosa und Submukosa) begrenzt.

Beide Krankheitsbilder zeigen ähnliche klinische Symptome, die heftige Durchfälle, krampfartige Bauchschmerzen, Gewichtsverlust, Übelkeit, Anämie und Fieber umfassen. Bei Morbus Crohn treten vermehrt Fisteln, Abszesse, Dünndarmkarzinome, intestinale Blutungen,

und bei ca. 20-30 % der Patienten ein Darmverschluss (Ileus) auf. Dagegen leiden Kolitis ulzerosa-Patienten unter erhöhtem Kolonkarzinomrisiko (Fiocchi 1998; Podolsky 1991). Im weiteren Verlauf der Krankheiten können extraintestinale Manifestationen auftreten. Am häufigsten sind dabei die Gelenke (Arthritis), aber auch die Unterschenkel (Erythema nodosum) und die Augen (z. B. Uveitis) betroffen.

1.3.1 Epidemiologie

Weltweit erkranken etwa 20-150 Personen auf 100.000 Einwohner pro Jahr an Morbus Crohn. Besonders betroffen sind dabei westliche Industrieländer. Die Zahl der Erkrankung ist immer noch steigend und hat sich seit 1960 um das 8-10fache erhöht. Bei der Kolitis ulzerosa beobachtet man unabhängig des Lebensstandards eine stabile weltweite Inzidenz von 10-20 Personen auf 100.000 Einwohner pro Jahr. Das Erkrankungsalter liegt bei beiden Fällen zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Dabei sind beide Geschlechter ungefähr gleich häufig betroffen (Lakatos 2006; Loftus, Jr. 2004; Macdonald & Monteleone 2005).

1.3.2 Therapie

Die medikamentöse Heilung der Erkrankungen gelingt bisher nicht. Die Therapie beider Krankheitsbilder zielt auf eine Reduktion des Entzündungsprozesses ab. Bei leichten bis mittelschweren Entzündungen (besonders bei Befall des Dickdarms) werden 5-Aminosalicylsäuren (z.B. Mesalazin und Sulfasalazin) verwendet. Dagegen werden Glukokortikoide bei schweren Krankheitsverläufen eingesetzt. Als Glukokortikoide werden häufig lokal wirkende Kortison-Abkömmlinge (Budesonid) eingesetzt, deren Nebenwirkungen deutlich geringer sind. Bei Unverträglichkeiten bzw. nicht Anspringen einer Kortison-Therapie werden Immunsuppressiva (Azathioprin, 6-Mercaptopurin oder Ciclosporin A bzw. Tacrolimus) verwendet. Patienten in Remission (temporäres Nachlassen der Krankheitssymptome) werden mit 5-Aminosalicylsäure oder dem probiotischen Bakterium *E. coli* Nissle behandelt. Ist bei starken Entzündungen trotz Einsatz von Medikamenten keine Besserung zu beobachten, müssen Teile des Darmes, bzw. bei Kolitis ulzerosa der gesamte Dickdarm, operativ entfernt werden.

1.3.3 Etiologie

Die Krankheitsursache der CED ist trotz intensiver Bemühungen noch nicht vollständig geklärt. Die Forschungsergebnisse weisen auf vier Faktoren hin, die bei der Entstehung der

Erkrankungen zusammenspielen: (i) genetische Prädisposition, (ii) Umwelteinflüsse, (iii) Mikroflora und (iv) eine Dysregulation des Immunsystems.

Erste Anzeichen für eine **genetische Prädisposition** chronisch entzündlicher Darmerkrankungen wurden durch erhöhte Prävalenzen in bestimmten ethnischen Bevölkerungsgruppen, sowie durch vermehrtes Auftreten der Erkrankungen innerhalb einer Familie erkannt. Verwandte ersten Grades erkranken an Morbus Crohn 15-35 mal, bzw. an Kolitis ulzerosa 7-15 mal häufiger als unvorbelastete Personen (Orholm *et al.* 1991). In Zwillingsstudien kann eine höhere Prävalenz bei monozygoten Zwillingen verglichen mit dizygoten Zwillingen beobachtet werden (Tysk *et al.* 1988). Durch genomweite Kopplungsanalysen konnten neun Suszeptibilitätsloci in verschiedenen chromosomalen Regionen identifiziert werden (Bonen & Cho 2003; Cho & Abraham 2007). Eine eindeutige Assoziation mit Morbus Crohn wurde allerdings bis jetzt nur auf Chromosom 16 durch Mutationen im Nod2/CARD (*caspase recruitment domain*) 15 Gen gezeigt (Newman & Siminovitch 2005). Die mit der Pathogenese assoziierten Gene regulieren angeborene Immunantworten und unterstützen die Funktionen der mukosalen Barriere (Sartor 2006).

Zu den **umweltbedingten Faktoren** zählen unter anderem Rauchen, Ernährung, Stress und Hygiene (Fiocchi 1998). Die genaue Wirkung dieser Faktoren ist noch weitgehend unklar. Es wird vermutet, dass sie einen Einfluss auf die mukosale Barriere, das Immunsystem oder auf die luminale Umgebung ausüben und damit die Suszeptibilität gegenüber CED erhöhen (Sartor 2006). Durch Rauchen konnte bei Morbus Crohn-Patienten eine Verschlechterung des Entzündungszustandes beobachtet werden, während bei Kolitis ulzerosa eine Besserung eintritt (Fiocchi 1998). Hinsichtlich der Ernährung konnte bislang kein Einfluss auf Morbus Crohn oder Kolitis ulzerosa nachgewiesen werden (Fiocchi 1998). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von Aluminium und Eisen als Adjuvants wirkt und die Virulenz von Bakterien steigert (Perl *et al.* 2004). Psychosomatische Ursachen der CED konnten durch Studien nicht bestätigt werden. Häufig auftretende Depressionen sind eher eine Folge der chronischen Erkrankung und der damit verbundenen Beeinträchtigung der Lebensqualität (Lerebours *et al.* 2007). Allerdings begünstigt Stress bei Remissionspatienten ein erneutes Auslösen der Entzündung (Mawdsley & Rampton 2005). Auffällig bei Morbus Crohn ist die hohe Zahl der Patienten in westlichen Industrieländern, sowie die steigende Patientenzahl in Entwicklungsländern. Daher wird ein zunehmender Hygienestatus mitverantwortlich für die Erkrankung gemacht (Gent *et al.* 1994; Hampe *et al.* 2003).

CED-Patienten zeigen **systemische Dysregulationen** des Immunsystems, die durch Aktivierung der unspezifischen und adaptiven Immunantwort, sowie durch Toleranzverlust

gegenüber Kommensalen gekennzeichnet ist (Duchmann *et al.* 1995; Sartor 2006). Im entzündeten Gewebe wurden Infiltrate von DCs, Makrophagen und Lymphozyten und ein deutlicher Anstieg proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-1 β , TNF und IL-8 beobachtet (Sartor 2006). Es konnte eine vermehrte Expression von TLRs und Adhäsionsmolekülen auf Epithelzellen gezeigt werden, durch die eine Aktivierung und Migration weiterer Immunzellen in das entzündete Gewebe begünstigt wird (Baumgart & Carding 2007; Sartor 2006). Bezüglich der T-Zell-Antworten unterscheiden sich Morbus Crohn und Kolitis ulzerosa. Bei Morbus Crohn liegt eine Th1-vermittelte Antwort vor, die eine starke IFN- γ und IL-12p40 Produktion bewirkt. Die Induktion der Th1-Zellen findet über APCs statt, die IL-12 und IL-18 sezernieren. Th1-Zellen aus Morbus Crohn-Patienten scheinen gegenüber Apoptose resistent zu sein und halten so den Entzündungsprozess in Gang (Itoh *et al.* 2001). Bei Kolitis ulzerosa liegt dagegen eher eine Th2-Antwort vor. Allerdings ist der Anstieg von IL-4 und IL-5, die normalerweise in Th2-Antworten produziert werden, nicht permanent erkennbar. Die Th2-Antwort bei Kolitis ulzerosa ist außerdem durch eine IL-13 Produktion der natürlichen Killerzellen gekennzeichnet. Die vermehrte IL-13 Produktion führt dabei zu einer zusätzlichen Schädigung des Epithels im Kolon (Fuss *et al.* 1996; Fuss *et al.* 2004).

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen spielt die **Mikroflora**. Dies bestätigen murine Kolitismodelle, in denen Tiere unter spezifisch-pathogenfreien (SPF) -Bedingungen eine Kolitis entwickeln, während die Tiere unter keimfreien Bedingungen gesund bleiben (Sartor 2004a). Des Weiteren kann in CED-Patienten durch die Behandlung mit Antibiotika eine Verbesserung der Entzündung, insbesondere bei Morbus Crohn, festgestellt werden (Sartor 2004b). Der Mechanismus, durch den Bakterien an der Erkrankung beteiligt sind, bedarf noch weiteren Untersuchungen. Studien zeigen eine Verschiebung der Bakterienzusammensetzung bei CED-Patienten. Im Darm dieser Patienten werden vermehrt *Bacteroides*, *E. coli* und *Enterkokken* und eine reduzierte Anzahl *Bifidobakterien* und *Lactobacillen* beobachtet (Sartor 2004a). Dadurch entsteht vermutlich ein proinflammatorisches luminales Milieu, das chronische Entzündungen fördert. CED-Patienten zeigen außerdem eine reduzierte Fähigkeit Bakterien zu eliminieren. Es konnte eine erhöhte Anzahl adhärenter Bakterien in der Mukosa, sowie resistenter Bakterien im Gewebe von Morbus Crohn- und Kolitis ulzerosa-Patienten beobachtet werden (Sartor 2004a; Swidsinski *et al.* 2002). Morbus Crohn-Patienten zeigen außerdem eine verminderte Defensin-Produktion (Wehkamp *et al.* 2005).

Neben diesen vier Faktoren werden als Ursache chronisch entzündlicher Darmerkrankungen auch krankheitserregende Keime diskutiert. Besonders *Mycobacterium*

avium subsp. *paratuberculosis* wird in Studien als möglicher Erreger erwogen. Dieses Bakterium führt in Rindern zur Johnschen Krankheit (Paratuberkulose), die histologisch dem Morbus Crohn sehr ähnlich ist. Morbus Crohn-Patienten weisen einen erhöhten Serumantikörpertiter gegen Mycobacterien, sowie eine erhöhte Anzahl des Bakteriums auf (Chamberlin *et al.* 2001; Chiodini *et al.* 1984; Collins *et al.* 2000; Fiocchi 1998; Hulten *et al.* 2001). Allerdings können sichere Nachweise zur Krankheitsentstehung bislang nicht erbracht werden (Hyams 2000; Karlinger *et al.* 2000). Bei Morbus Crohn steht außerdem ein Subtyp der Spezies *Escherichia coli* in Verdacht bei der Pathogenese beteiligt zu sein (Darfeuille-Michaud *et al.* 1998).

1.4 Tiermodelle zur Untersuchung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Durch Tiermodelle können wichtige Krankheitsaspekte *in vivo* reproduzierbar untersucht werden. Im Gegensatz zur Patientenuntersuchung können hier zeitliche Verläufe und pathophysiologische Veränderungen vor dem Krankheitsausbruch untersucht werden. Außerdem ist es möglich, Aussagen über Umweltfaktoren und Nahrungsantigene durch spezielle Haltungsmethoden (konventionelle, pathogenfreie und keimfreie Haltung), sowie der Futterzusammensetzung zu treffen. Ein ganz entscheidender Vorteil ist die Untersuchung genetischer Faktoren. Durch genetische Modelle können immunregulatorische Signalwege analysiert und spezifische Therapeutika identifiziert werden. Formal werden CED-Tiermodelle in vier Kategorien eingeteilt (Tab. 2). In spontanen oder chemisch induzierbaren Modellen werden immunkompetente Wirte eingesetzt, während adoptive Transfermodelle von immunkomprimierten Organismen ausgehen. In genetisch manipulierten Modellen werden in das Erbgut entweder Gene eingeschleust (transgen) oder deletiert (knock-out).

Tab. 2: Einteilung der CED-Tiermodelle

Modell	Beispiele
Spontane Mausmodelle	C3H/HeJBir (Sundberg <i>et al.</i> 1994)
Chemisch induzierte Modelle	DSS (<i>dextran sulfate sodium</i>) (Mahler <i>et al.</i> 1998) TNBS (<i>trinitrobenzene sulfonic acid</i>) (Neurath <i>et al.</i> 1995) Oxazolol (Boirivant <i>et al.</i> 1998)
Adoptiver Zelltransfer Modelle	Transfer von CD4 ⁺ CD45RB ^{hi} in SCID- (<i>severe combined immunodeficiency</i>) oder RAG- (<i>recombinase-activating gene</i>) - defiziente Mäuse (Corazza <i>et al.</i> 1999; Powrie <i>et al.</i> 1993)
Genetisch manipulierte Modelle	T-Zell-Rezeptor- α -defiziente Maus (Mombaerts <i>et al.</i> 1993) IL-2-defiziente Maus (Sadlack <i>et al.</i> 1993) IL-10-defiziente Maus (Kuhn <i>et al.</i> 1993) Gai2-defiziente Maus (Rudolph <i>et al.</i> 1995) STAT (<i>signal transducer and activator of transcription</i>) 4-defiziente Maus (Wirtz <i>et al.</i> 1999)

Je nach Tiermodell sind unterschiedliche Ursachen an der Kolitisentwicklung beteiligt. Im Modell der C3H/HeJBir Mäuse entsteht die spontane Kolitis durch überschießende CD4⁺-T-Zellen, die gegen die Mikroflora der Tiere reagieren. Durch DSS (*dextran sulfate sodium*) wird dagegen das Epithel zerstört; es entstehen chronische Läsionen, in die Makrophagen und CD4⁺-T-Zellen einströmen. Im adoptiven Zelltransfermodell konnte im Darm hauptsächlich IL-12 und eine Polarisierung der transferierten T-Zellen in Th1-Richtung nachgewiesen werden. Die Mikroflora spielt in diesem System eine bedeutende Rolle, da keimfreie SCID^{-/-} (*severe combined immunodeficiency*) oder RAG^{-/-} (*recombinase-activating gene*) Mäuse schwächere Entzündungen zeigen. In genetisch manipulierten Mausmodellen werden CD4⁺-T-Zellen für die Entstehung der Entzündungen verantwortlich gemacht. Dabei wird eine Verschiebung des Th1/Th2 Gleichgewichts hauptsächlich in Th1-, aber auch in Th2-Richtung (je nach Tiermodell) beobachtet. Die Störung des Gleichgewichts kann durch eine überschießende Reaktion von Effektor-T-Zellen (z.B. STAT4-defiziente Maus) oder durch eine Funktionseinschränkung der T_{reg} Zellen (z.B. IL-2-defiziente Maus) entstehen (Strober *et al.* 2002).

1.4.1 IL-2-defizientes Mausmodell

Interleukin 2 (IL-2) wird hauptsächlich von aktivierten CD4⁺-T-Zellen, aber auch von CD8⁺-T-Zellen, DCs und thymischen Zellen produziert. IL-2 fördert die Proliferation und Differenzierung von T-, NK- und B-Zellen, aktiviert Makrophagen und führt durch Apoptose oder durch aktivierten induzierten Zelltod (*activation induced cell death*, AICD) zur Eliminierung selbst-reaktiver T-Zellen (Lenardo 1991; Van *et al.* 1999). Außerdem wird IL-2 für die Entwicklung, Expansion und Erhaltung regulatorischer T-Zellen benötigt (Fontenot *et al.* 2005; Setoguchi *et al.* 2005). Die Produktion von IL-2 ist in T-Zellen streng reguliert. Die Signalinduktion verläuft über einen spezifischen Multiketten-Rezeptor, der aus den drei Untereinheiten IL2R α (CD25), IL-2 β (CD122) und der γ -Kette (γ_c , CD132) besteht (Waldmann 2006). Um die genaue Funktion von IL-2 *in vivo* zu bestimmen, wurden IL-2-defiziente (*IL-2*^{-/-})-Mäuse generiert (Schorle *et al.* 1991).

IL-2^{-/-}-Mäuse auf BALB/c Hintergrund sterben bereits im frühen Alter an Autoimmunreaktionen gegen hematopoetische Zellen und in Folge dessen an Anämie (Ehrhardt *et al.* 1997). Dagegen entwickeln sich *IL-2*^{-/-}-Mäuse auf C57Bl/6 oder Mischhintergrund in den ersten Lebenswochen unter spezifisch-pathogenfreien (SPF)-Bedingungen normal, erkranken aber zwischen der vierten bis neunten Woche an einer autoimmunhämolytischen Anämie, in deren Folge etwa 50 % der Tiere sterben. Die überlebenden Tiere entwickeln zwischen der sechsten und fünfzehnten Woche eine Kolitis, die vergleichbar mit der Kolitis ulcerosa auf den Dickdarm beschränkt ist (Sadlack *et al.* 1993). Kennzeichnend für die Entzündung ist die Infiltration von Lymphozyten, Plasmazellen und Granulozyten. Die Bestimmung des intestinalen Zytokinmusters zeigt hauptsächlich Th1-Zytokine, wie z.B. IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α und das dem menschlichen IL-8 homologe KC (Autenrieth *et al.* 1997; Meijssen *et al.* 1998; Waidmann *et al.* 2002). Dieses Zytokinprofil ähnelt der Zytokinproduktion bei Morbus Crohn. In Epithelzellen der *IL-2*^{-/-}-Mäuse wird eine erhöhte Expression von IL-15 beobachtet. IL-15 besitzt ähnliche biologische Eigenschaften wie IL-2 und wird wahrscheinlich daher vermehrt exprimiert (Ehrhardt *et al.* 1997; Meijssen *et al.* 1998; Schultz *et al.* 1999).

Durch Kreuzung der *IL-2*^{-/-}-Mäuse mit *RAG*^{-/-}-Mäusen (besitzen weder B- noch T-Zellen) und *JH*^{-/-}-Mäusen (besitzen keine B-Zellen) konnten T-Zellen für die Entstehung der Kolitis bei *IL-2*^{-/-}-Mäusen verantwortlich gemacht werden, da nur *IL-2*^{-/-}*JH*^{-/-}-Mäuse weiterhin an einer Kolitis erkrankten (Ma *et al.* 1995). Die infiltrierenden T-Zellen waren CD4⁺-Th1-Zellen (Sadlack *et al.* 1995; Simpson *et al.* 1995). Weitere Untersuchungen zeigten einen Mangel regulatorischer T-Zellen in *IL-2*^{-/-}-Mäusen (Malek *et al.* 2002; Wolf *et al.* 2001).

Dieser T_{reg}-Mangel konnte durch Gabe von IL-2, bzw. IL-2 produzierenden Zellen wieder aufgehoben werden (Almeida *et al.* 2002; Furtado *et al.* 2002; Klebb *et al.* 1996). Da IL-2 für den Wachstum, sowie den Erhalt von T_{reg} eine große Rolle spielt (Fontenot *et al.* 2005; Setoguchi *et al.* 2005), wird die Dysregulation der Th1-Antwort weitgehend durch einen Mangel regulatorischer T-Zellen erklärt.

Ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung der Kolitis in *IL-2*^{-/-}-Mäusen ist die intestinale Mikroflora. Mäuse unter konventioneller Haltung entwickeln im Vergleich zu Mäusen unter spezifisch-pathogenfreier (SPF) Zucht eine ausgeprägtere Kolitis (Ehrhardt *et al.* 1997; Sadlack *et al.* 1993; Schultz *et al.* 1999). Übereinstimmend damit entwickeln keimfreie Tiere keine, bzw. nur eine sehr milde, verzögerte Darmentzündung (Contractor *et al.* 1998; Ehrhardt *et al.* 1997; Waidmann *et al.* 2003), die vermutlich durch totes Bakterienmaterial aus autoklaviertem Futter und Streu hervorgerufen wird. Waidmann *et al.* konnten zeigen, dass verschiedene kommensale Bakterienstämme in *IL-2*^{-/-}-Mäusen unterschiedliches kolitogenes Potential besitzen. *IL-2*^{-/-}-Mäuse, die mit *Escherichia coli* mpk (Max von Pettenkofer) monokolonisiert wurden, entwickelten nach ca. 20-22 Wochen eine Kolitis, dagegen zeigten *Bacteroides vulgatus* mpk-monokolonisierte *IL-2*^{-/-}-Mäuse selbst nach 33 Wochen keine auffälligen histologischen Befunde. Mit *E. coli* mpk und *B. vulgatus* mpk-kokolonisierte Mäuse blieben ebenfalls gesund, weshalb *B. vulgatus* mpk in diesem Mausmodell eine protektive Wirkung zugeschrieben wurde (Waidmann *et al.* 2003).

1.4.2 *In vitro* Modell mit knochenmarksgereiften dendritischen Zellen

DCs spielen bei der Aktivierung des Immunsystems durch die Aufnahme von Antigenen und der anschließenden Präsentation an naive T-Zellen eine wichtige Rolle. Da *E. coli* mpk-kolonisierte *IL-2*^{-/-}-Mäuse eine Kolitis entwickelten, während *B. vulgatus* mpk-kolonisierte Tiere gesund blieben, wurde *in vitro* untersucht, welchen Einfluss die beiden Bakterien auf knochenmarksgereifte DCs ausüben (Frick *et al.* 2006). Es wurde die Zytokinproduktion und die Expression der kostimulatorischen und MHC-Klasse-II Moleküle bestimmt. Die Stimulation dendritischer Zellen mit *E. coli* mpk führte zu maturierten DCs, die eine hohe Expression der kostimulatorischen und MHC-Klasse-II Moleküle und einen deutlichen Anstieg der TNF- α , IL-12 und IL-6 Produktion zeigten. Dagegen produzierten *B. vulgatus* mpk-stimulierte DCs hauptsächlich IL-6, andere Zytokine (TNF- α , IL-12, IL-10) wurden kaum induziert. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle war in diesen DCs gering, während MHC-Klasse-II stärker exprimiert wurde. *B. vulgatus* mpk-stimulierte DCs zeigten im Vergleich zu *E. coli* mpk-stimulierten DCs nur ein geringes T-Zell-Aktivierungspotential.

Die Restimulation *B. vulgatus* mpk-vorbehandelter DCs mit *E. coli* mpk resultierte in einer deutlichen Reduktion der TNF- α Sekretion und T-Zell-Aktivierung im Vergleich zu naiven *E. coli* mpk-stimulierten DCs. Nur die Produktion von IL-6 blieb unverändert hoch. Auch durch die Vorstimulation mit Überständen *B. vulgatus* mpk-stimulierter DCs und anschließender *E. coli* mpk-Restimulation wurde eine reduzierte TNF- α Produktion festgestellt. Die geringere Responsivität der *B. vulgatus* mpk/*E. coli* mpk-stimulierten DCs konnte durch neutralisierende Antikörper gegen IL-6 aufgehoben werden, bzw. durch die Vorstimulation mit rekombinantem IL-6 und anschließender *E. coli* mpk-Restimulation induziert werden (Frick *et al.* 2006). Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass der *B. vulgatus* induzierte protektive, antiinflammatorische Effekt gegenüber einer nachfolgenden Stimulation mit *E. coli* auf IL-6 zurückzuführen ist (Frick *et al.* 2006).

Trotz der bekannten proinflammatorischen Eigenschaften von IL-6, konnten neuere Studien eine IL-6-abhängige Differenzierung dendritischer Zellen zu einem semi-maturen Phänotyp (CD40^{lo}CD80^{lo}MHCII^{hi}) zeigen (Frick *et al.* 2006; Geisel *et al.* 2007; Hegde *et al.* 2004). In diesen semi-maturen DCs lagen funktionelle Einschränkungen in der Migration dendritischer Zellen zu regionären Lymphknoten und eine reduzierte T-Zell-Aktivierung vor (Hegde *et al.* 2004).

1.4.3 Verwendete Bakterien

Die Gattung *Bacteroides* umfasst mehr als 30 % der Bakterien im Fäces und Mukus und ist somit ein bedeutender Vertreter im Darmtrakt von Säugern (Backhed *et al.* 2005). Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *Bacteroides vulgatus* mpk ist ein apathogenes, gramnegatives, obligat anaerobes Stäbchen. Phylogenetische Untersuchungen zeigen eine starke Verwandtschaft mit *Porphyromonas gingivalis*, der aufgrund seines Lipid A-Aufbaus von antigenpräsentierenden Zellen hauptsächlich über TLR2 erkannt wird (Hirschfeld *et al.* 2001). Es wird vermutet, dass *B. vulgatus* aufgrund der engen Verwandtschaft einen vergleichbaren Lipid A-Aufbau wie *P. gingivalis* besitzt und Zellen ebenfalls über TLR2 aktiviert.

In einigen Tiermodellen zeigten andere *B. vulgatus* Stämme kolitogene Eigenschaften (Onderdonk *et al.* 1987; Rath *et al.* 1999), während *B. vulgatus* mpk im IL-2-defizienten Mausmodell eine protektive Wirkung ausübt (Waidmann *et al.* 2003). Der in dieser Arbeit eingesetzte *B. vulgatus* mpk wurde aus dem Fäces von SPF-kolonisierten *IL-2*^{-/-}-Mäusen isoliert und wird im Weiteren als *B. vulgatus* bezeichnet.

Escherichia coli wurde 1919 von Theodor Escherich entdeckt. Es handelt sich um ein gramnegatives, säurebildendes, fakultativ anaerobes Stäbchen, das zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehört. Die meisten *E. coli* Stämme sind apathogen und Bestandteil der menschlichen und tierischen Darmflora. *E. coli mpk* wurde aus dem Fäces von SPF-kolonisierten *IL-2^{-/-}*-Mäusen isoliert und wird in der Arbeit als *E. coli* bezeichnet. Zur Kontrolle der Apathogenität dieses Stammes, wurden verschiedene Pathogenitätsfaktoren untersucht (z.B. *stxI*, *st-IIb*, *stII-cB* (EHEC), *ipaH*, *ial* (EIEC), *Eaf-Plasmid*, *eaeA* (EPEC), LT/H, ST/H (ETEC)). Keiner dieser Faktoren war in *E. coli mpk* nachweisbar (Waidmann *et al.* 2003).

1.5 Fragestellung

IL-2-defiziente-Mäuse entwickeln unter SPF-Bedingungen eine ausgeprägte Kolitis, während Tiere unter keimfreien Bedingungen gesund bleiben. Die Monokolonisierung der *IL-2^{-/-}*-Mäuse mit *E. coli* führt zur Darmerkrankung, während *B. vulgatus*-monokolonisierte Tiere keine Anzeichen einer Entzündung zeigen. In kokolonisierten Tieren kann *B. vulgatus* die durch *E. coli* induzierte Kolitis sogar verhindern. Wildtyp (WT)-Mäuse bleiben unabhängig von der Kolonisierung gesund (Waidmann *et al.* 2003). Die Kolitis der SPF-kolonisierten Tiere wird aufgrund mangelnder regulatorischer T-Zellen verursacht (Malek *et al.* 2002; Wolf *et al.* 2001), die zu einer überschießenden Th1-Antwort CD4⁺-Zellen führt (Ma *et al.* 1995; Simpson *et al.* 1995; Strober *et al.* 2002). Für die Aktivierung und Polarisierung der T-Zellen in der Lamina propria sind im wesentlichen DCs verantwortlich, die Antigene in der Lamina propria aufnehmen, in die Lymphknoten migrieren und dort naive T-Zellen stimulieren.

Es sollte untersucht werden, ob die beiden in der natürlichen Darmflora vorkommenden Bakterien *B. vulgatus* und *E. coli* zu einer unterschiedlichen Modulation intestinaler dendritischer Zellen in der Lamina propria (LP-DCs) führen. Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung intestinaler dendritischer Zellen in der Lamina propria *E. coli*- und *B. vulgatus*-monokolonisierter, sowie *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierter Tiere. Als Referenztiere dienten SPF-kolonisierte und keimfreie Tiere. Die dendritischen Zellen der Lamina propria (LP-DCs) in den unterschiedlich kolonisierten Tiere sollten hinsichtlich des Aktivierungs- und Maturationszustandes, der DC-Anzahl, der Lokalisierung und der DC-Subpopulationen untersucht werden.

Vorarbeiten in knochenmarksgereiften DCs zeigen in *B. vulgatus*-stimulierten DCs die Induktion eines semi-maturen Phänotyps (CD40^{lo}CD80^{lo}MHCII^{hi}), während *E. coli*-

stimulierte DCs zu maturaen DCs ($CD40^{hi}CD80^{hi}MHCII^{hi}$) differenzieren (Frick *et al.* 2006). Semi-mature DCs sind in der Literatur im Vergleich zu maturaen DCs durch eine reduzierte CCR7-Expression, ein vermindertes Migrationspotential und ein geringes T-Zell-Aktivierungspotential beschrieben (Frick *et al.* 2006; Hegde *et al.* 2004). LP-DCs der unterschiedlich kolonisierten *IL-2^{-/-}*-Mäuse sollten daher auch hinsichtlich ihrer CCR7-Expression geprüft werden. Zur Bestimmung des Migrationspotentials der LP-DCs in die mesenterialen Lymphknoten sollte in einem weiteren Schritt die DC-Anzahl und der Aktivierungszustand dendritischer Zellen in den mesenterialen Lymphknoten untersucht werden.

Ein weiteres Ziel war die Untersuchung des T-Zell-Aktivierungspotentials durch LP-DCs. Die Zytokinproduktion der T-Zellen ermöglicht es Rückschlüsse auf die T-Zell-Aktivierung und ihre Polarisierung zu ziehen. Es sollten T-Zellen der *IL-2^{-/-}*-Mäuse aus der Lamina propria isoliert und ihre Zytokinproduktion untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Mäuse

Für die Versuche wurden 14-16 Wochen alte C57Bl/6x129/Ola IL-2-defiziente Mäuse und die entsprechenden Wildtyp-Mäuse aus eigener Zucht verwendet. Die Mäuse wurden unter gnotobiotischen Bedingungen an der Universität Ulm (Deutschland) gezüchtet. Dort wurden sie entweder keimfrei gehalten, oder mit *E. coli* mpk, *B. vulgatus* mpk oder mit *E. coli* mpk und *B. vulgatus* mpk kokolonisiert. In zweiwöchigen Abständen wurde der gnotobiotische Status der Tiere überprüft. Mäuse aus spezifisch-pathogenfreier (SPF) Zucht wurden aus dem Tierstall des Universitätsklinikums Tübingen verwendet (Waidmann *et al.* 2003). Die Genotypisierung der Tiere erfolgte wie von Sadlack *et al.* beschrieben (Sadlack *et al.* 1993).

Zur Isolation von Knochenmarkszellen wurden C57BL/6x129Sv oder *IL-6*^{-/-}-Mäuse im Alter von 6-10 Wochen verwendet.

2.2 Expansion dendritischer Zellen mittels Flt3-Ligand *in vivo*

IL-2^{-/-}-Mäusen wurden 3×10^6 B16-FL Zellen subkutan verabreicht. Diese murine melanome Tumorzelllinie produziert konstitutiv murinen Flt3-Ligand (Mach *et al.* 2000). Nach 14 Tagen wurden die Tiere getötet und die Oberflächenmarker und intrazellulären Zytokine der LP-DCs untersucht.

2.3 Isolation der Leukozyten aus den mesenterialen Lymphknoten und der Lamina propria

Aus den Mäusen wurden die mesenterialen Lymphknoten präpariert, in 10 ml PBS (Invitrogen) mit 1 % FCS (Sigma) aufgenommen und durch ein 100 µm feines Metallsieb gepresst. Die Zellsuspension wurde noch zweimal mit PBS / 1 % FCS gewaschen und bis zur FACS-Färbung auf Eis gestellt.

Zur Isolation der Leukozyten aus der Lamina propria wurde der Gesamtdarm aus den Mäusen entnommen, die Peyerschen Plaques entfernt, und der Darm der Länge nach aufgeschnitten. Nach dem Waschen mit PBS wurde der Darm für 15 min bei 37°C in Separationsmedium unter leichtem Schütteln inkubiert. Durch das Separationsmedium wird das Epithel vom Gewebe getrennt. Um restliche Epithelzellen zu entfernen, wurde das verbleibende Gewebe in PBS mit 1 % FCS gewaschen und anschließend in kleine Stücke geschnitten, die dann im Verdaumedium für 90 min bei 37°C unter leichtem Schütteln verdaut wurden. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde 0,5 mg/ml Kollagenase Type VIII

(Sigma) und 5 U/ml DNase I (Roche) zugegeben. Die Zellsuspension wurde im nächsten Schritt durch ein 100 µm feines Metallsieb passiert, bei 400 x g für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 40 % Percoll (density: 1.124; Biochrom AG) in PBS / 1 % FCS resuspendiert. Nun wurde die Suspension vorsichtig über 70 % Percoll in PBS / 1 % FCS geschichtet und für 20 min bei 850 x g zentrifugiert. Das Interface, das die lebenden Zellen enthält, wurde abpipettiert und in PBS mit 1 % FCS gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen für die FACS-Analyse weiter verwendet.

Tab. 3: Medien zur Isolation Lamina propria dendritischer Zellen.

Separationsmedium	Verdaumedium
1 mM DTT (AppliChem)	RPMI 1640 (Biochrom AG) Medium mit 5 % FCS
1 mM EDTA (Sigma)	2 mM Glutamin (Invitrogen)
in Ca ²⁺ /Mg ²⁺ freiem PBS (Biochrom AG) mit 1 % FCS	100 U/ml Penicillin (Invitrogen)
	100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen)
	50 µM β-Mercaptoethanol (Sigma)

2.4 Zellkultur

2.4.1 Isolation knochenmarksgereifter dendritischer Zellen

DCs wurden aus 6-8 Wochen alten C57BL/6x129Sv (Wildtyp) oder *IL6*^{-/-}-Mäusen nach Lutz *et al.* isoliert und kultiviert (Lutz *et al.* 1999). Dabei wurden Femur und Tibia aus der Maus entnommen, Muskelreste vom Knochen entfernt und durch Spülen der einzelnen Knochenstücke mit PBS die Knochenmarkszellen isoliert. Anschließend wurde bei 400 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 20 ml 37°C warmen DC-Medium resuspendiert. Als DC-Medium wurde RPMI 1640 mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 50 µM β-Mercaptoethanol, 1 % (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren (Biochrom) 200 U/ml GM-CSF (produziert durch die Mausmyelom Zelllinie P3X63) verwendet.

Von der Zellsuspension wurde je 1 ml in eine mit 10 ml DC-Medium vorbereitete 100 mm Petrischale (Greiner) ausgesät, dies entspricht 2 x 10⁶ Zellen / Schale. Am 3. Tag nach Zellisolation wurde 10 ml Medium in die Petrischalen gegeben, während am Tag 6 aus jeder Schale 10 ml Medium entnommen wurde, bei 400 x g für 5 min zentrifugiert und das

Zellpellet mit der gleichen Menge frischem DC-Medium resuspendiert wurde. Am 8. Tag wurden die Zellen geerntet und für die Stimulation verwendet.

2.4.2 Kultivierung von Bakterien

Zur Stimulation der DCs wurden *E. coli* mpk und *B. vulgatus* mpk verwendet. Beide Stämme wurden aus der fäkalen Flora der SPF-*IL-2^{-/-}*-Mäuse im Max von Pettenkofer Institut (München) isoliert (Waidmann *et al.* 2003). *E. coli* mpk induzierte in *IL-2^{-/-}*-Mäusen eine Kolitis, während *B. vulgatus* mpk kolonisierte Tiere keine Darmentzündung entwickelten.

E. coli mpk wurde in einer über Nacht Kultur in Luria-Bertani (LB)-Medium bei 37°C im Rotations-Schüttler angeimpft. Ungefähr 2 h vor Stimulation wurde die über Nacht Kultur überimpft, um Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase zu erhalten. Zur Stimulation wurden nur Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase verwendet. *B. vulgatus* mpk wurde in brain-heart-infusion (BHI)-Medium unter anaeroben Bedingungen für 48 h kultiviert.

Beide Bakterienstämme wurden vor der Stimulation mit PBS gewaschen und durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm am Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) quantifiziert.

Zur Aufbewahrung der Bakterien wurden Bakterienkryostocks in LB-Medium mit 20 % Glycerol (Merck) hergestellt, die bei -80°C gelagert wurden.

2.4.3 Stimulation knochenmarksgereifter dendritischer Zellen

Am 8. Tag nach der Zellisolation aus dem Knochenmark, wurden die nicht-adhärenen Zellen geerntet, zweimal in PBS gewaschen und in antibiotikafreiem Medium resuspendiert. Für FACS-Analysen wurden in 100 mm Petrischale (Greiner Bio-One) 1×10^6 , für mRNA-Bestimmung und Migrations-Assays 3×10^6 bzw. 5×10^6 Zellen in 10 ml ausgesät und nach 1 h Ruhezeit (37°C, 5 % CO₂) mit der Stimulation begonnen.

Die DCs wurden mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 1 mit *E. coli* mpk oder *B. vulgatus* mpk für 1 h stimuliert, die Bakterien mit Gentamycin (0,1 mg/ml; Sigma) getötet und die Zellen für weitere 20 h (FACS-Analyse und Migrations-Assay) oder 4 h (mRNA-Bestimmung) bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Untersuchung der Responsivität der DCs gegenüber LPS wurden DCs mit *B. vulgatus* MOI1 oder LPS (1 µg/ml; Sigma) für 24 h stimuliert, oder mit *B. vulgatus* MOI1 für 24 h vorstimuliert und anschließend mit LPS (1 µg/ml) für weitere 24 h restimuliert. Die Zellen wurden geerntet und für FACS-Analyse, mRNA-Bestimmung, Migrations-Assays oder für ELISA eingesetzt.

2.4.4 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Um die Zytokin-Konzentration in Zellüberständen zu bestimmen, wurden OptEIA ELISA Sets (Becton Dickinson) für IL-6, TNF- α , IFN- γ und IL-10 nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Zytokin-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem ELISA-Reader (Tecan) bestimmt.

2.4.5 Migrations-Assay

Am 9. Tag nach Zellisolation wurden die mit *E. coli* oder *B. vulgatus* stimulierten Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und anschließend 5×10^5 Zellen in 200 μ l RPMI 1640 resuspendiert und in ein Transwell Zellkultur Insert mit 6,5 mm Durchmesser und 3 μ m Porengröße (BD PharMingen) gegeben. Die Chemokine CCL19 und CCL21 (PeproTech Inc.) wurden beide in einer Konzentration von 100 ng/ml in das untere Kompartiment pipettiert. Nach 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ wurde die Anzahl der migrierten DCs im unteren Kompartiment mittels FACS bestimmt. Als Negativkontrolle diente die Anzahl der migrierten Zellen ohne Chemokin-Zugabe.

2.5 Analyse der mRNA Expression mittels quantitative real-time PCR

2.5.1 mRNA-Isolation aus knochenmarksgereiften DC und intestinalem Gewebe

3×10^6 *E. coli* mpk oder *B. vulgatus* mpk stimulierte DCs wurden nach 4 h Stimulation abgeerntet, mit PBS gewaschen, in 350 μ l RLT-Puffer (Quiagen) mit 1 % β -Mercaptoethanol (Sigma) aufgenommen, resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Zur mRNA-Isolation wurden die Proben bei RT aufgetaut und mit dem RNeasy Mini Kit (Quiagen) bearbeitet. Dabei handelt es sich bei dem oben genannten RLT-Puffer um einen Lysepuffer mit einer hohen Konzentration an Guanidiniumthiocyanat, das neben der sehr effektiven Denaturierung von Proteinen und RNasen zusätzlich noch die Bindung der im Lysat vorhandenen RNA an die RNA Bindematrix der Minisäulen fördert. In mehreren Waschschrritten wird dann die gebundene RNA von Salzen, Metaboliten und anderen makromolekularen Zellkomponenten gereinigt. Bei der Anwendung des Kits wurden Pipetten, Ständer und Arbeitsplatz mit RNase away (MolecularBioProducts) behandelt und die Isolation zügig durchgeführt. Im ersten Schritt wurde der Probe gleiches Volumen (350 μ l) 70 % Ethanol zugegeben, gut gemischt und das gesamte Volumen auf die Mini-Säulen überführt. Nach der Zentrifugation für 20 s bei 8000 x g wurde der Durchfluss verworfen und auf die Säule 700 μ l RW1 Puffer gegeben, wieder für 20 s bei 8000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde nun

in ein neues Sammelröhrchen gestellt und 500 µl RPE Puffer auf die RNeasy Säule pipettiert, für 20 s bei 8000 x g zentrifugiert und der Inhalt des Sammelröhrchens verworfen. Dieser Schritt wurde nochmals durchgeführt. Zum Trocknen der Säule wurde 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und anschließend die mRNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Um eine höhere RNA-Konzentration zu erhalten, wurde dieser Vorgang bei Bedarf mit dem ersten Eluat wiederholt. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und die RNA-Konzentration bestimmt. Dazu wurde eine 1:10 Verdünnung mit RNase freiem Wasser hergestellt und die Proben in einem UV-Spektrometer (BioPhotometer, Eppendorf) gemessen. Dabei entspricht eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm einer Konzentration von 40 µg/ml einzelsträngiger RNA. Das Verhältnis der Extinktionen von 260 nm zu 280 nm gibt an wie stark die extrahierte RNA mit Alkohol und Resten von Proteinen, deren Absorptionsmaximum durch die Absorption der aromatischen Aminosäurereste bei 280 nm liegt, verunreinigt ist. Ein Verhältnis von 2,0 spricht für eine reine RNA-Isolierung. Proben, die im Absorptionsverhältnis nicht im Bereich von 1,8 und 2,1 lagen, wurden verworfen.

2.5.2 cDNA-Synthese und PCR

Zur spezifischen Amplifikation bestimmter Gentranskripte muss die isolierte RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden, um anschließend den gewünschten Bereich mit spezifischen Primern durch die Polymerase Kettenreaktion zu amplifizieren. Zum Umschreiben wurde das Quantitect Reverse Transcription-Kit (Quiagen) verwendet. In diesem Kit wird zuerst die genomische DNA eliminiert. Damit wird verhindert, dass eventuell unspezifische Primer neben der RNA auch genomische DNA detektieren. Dazu wurde im ersten Schritt aus der isolierten RNA 1,5 µg RNA entnommen, 3 µl gDNA Wipeout Puffer zugegeben, mit RNase freiem Wasser auf 21 µl aufgefüllt und bei 42°C für 2 min inkubiert. Für die Reverse Transkription der RNA wurde ein Mastermix aus Puffer und Primern nach Herstellerangaben angefertigt, die Template RNA aus dem ersten Schritt zugegeben und zuletzt die Quantiscript Reverse Transkriptase zupipettiert. Nach einer Inkubation bei 42°C für 30 min wird die Transkriptase durch Erhitzen auf 95°C für 3 min inaktiviert. Die cDNA wurde bei -20°C eingefroren oder direkt für die quantitative real-time PCR weiterverwendet.

Die quantitative real-time PCR beruht auf dem Prinzip der PCR und bietet zusätzlich die Quantifizierung der Nukleinsäuren. Dabei findet die Quantifizierung während den PCR-Zyklen durch Fluoreszenz-Messungen statt. Es gibt verschiedene Möglichkeiten die PCR-Produkte zu detektieren. In dieser Arbeit wurden Taqman-Sonden eingesetzt, die aus

sequenzspezifischen Oligonukleotiden bestehen und am 5' Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff bzw. am 3' Ende mit einem Quencher markiert sind. Die Sonden lagern sich während des Annealing-Schrittes an die cDNA an, dabei verhindert der kurze Abstand zwischen dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und dem Quencher die Fluoreszenz. Während des nächsten PCR-Schrittes verlängert die Taq-Polymerase die Primer. Durch die 5'-3'Exonucleaseaktivität der Polymerase wird die Sonde abgebaut und dadurch der Reporter-Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt, was zur Fluoreszenz führt. Das Fluoreszenzsignal erhöht sich proportional zur Menge der entstehenden PCR-Produkte. Da Unterschiede in der Konzentration der eingesetzten mRNA, sowie in der Effizienz der reversen Transkription nicht auszuschließen sind, wurde neben einem internen Standard, noch ein externer Standard mitgeführt, ein so genanntes Housekeeping-Gen. Es wird angenommen, dass dieses Gen in den untersuchten Ansätzen in einer konstanten Menge exprimiert wird. Daher wird die Menge an spezifischem Produkt auf dieses Housekeeping-Gen bezogen. In dieser Arbeit wurde Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) verwendet.

Der interne Standard wurde durch Mischen der zu messenden Proben und den daraus hergestellten Verdünnungen erstellt. Für den Mastermix wurde je Probe 3,6 µl Wasser, 10 µl TaqmanSuperMix (Invitrogen), 0,4 µl RoxReferenceDye (Invitrogen) und 1 µl spezifischer Primer des zu untersuchenden Gens (Applied Biosystems) zugegeben. Dazu wurden jeweils 5 µl cDNA pipettiert und die Proben im 96-Lochformat (PeqLab) als Doppelwerte in einem GeneAmp 5700 Sequence detection System (Applied biosystems / Applera) analysiert.

Tab. 4: Verwendete Primer zur quantitativen Real-Time PCR

Taqman Primer	NCBI Zugangsnummer	Bestellnummer (Applied Biosystems)
CCR7	NM_007719.2	Mm00432608_m1
IL-6	NM_031168.1	Mm00446190_m1
TNF- α	NM_013693.2	Mm00443259_g1
GAPDH	NM_008084.2	Mm99999915_g1

Die Temperaturbedingungen der Zyklen waren wie folgt: 2 min bei 50°C, 10 min bei 95°C, dann 40 Zyklen, in denen erst 15 s auf 95°C und anschließend 1 min auf 60°C erwärmt wurde. Die Daten wurden über den internen Standard quantifiziert und anschließend auf GAPDH normalisiert.

2.6 Durchflusszytometer

2.6.1 Bestimmung der Zelloberflächenmarker

Um unspezifische Bindungen der Antikörper an Fc-Rezeptoren zu verhindern, wurde mit 2.4G2 (BD PharMingen) monoklonalem Antikörper (mAk), der gegen die Fc γ RIII/II CD16/CD32 Rezeptoren gerichtet ist, geblockt (4°C, 15 min). Nach dem Waschen wurden die Zellen mit mAk gegen die Zelloberflächenstrukturen bei 4°C für 30 min inkubiert. Die verwendeten mAk sind in Tab. 5 aufgeführt. Bis auf anti-CCR7 (NatuTec) wurden alle Antikörper von BD PharMingen bezogen. Als sekundäre Antikörper diente Streptavidin-PercP oder Streptavidin-APC (BD PharMingen), die für 15 min bei 4°C inkubiert wurden. Um tote Zellen auszuschließen, wurden knochenmarksgereifte DCs mit Propidiumiodid (5 ng/100 μ l; Calbiochem) gefärbt. Drei- oder vierfach Färbungen wurden durchflusszytometrisch auf einem FACSCalibur (Becton & Dickinson) analysiert. Dabei wurde die Größe und Granularität der Zellen als zusätzlicher Parameter genutzt, um tote Zellen oder Zellklumpen auszuschließen. Die Daten wurden mittels WinMDI version 2.8 software von J. Trotter (Scripps Institute) ausgewertet.

Zum Sorten der CD11c⁺-Zellen wurde eine CD11c-Färbung mit APC-konjugiertem mAk durchgeführt und die Proben in der Flow Cytometry Core Facility an der Universitätsklinik Tübingen an einem FACSAria Gerät (Becton & Dickinson) nach CD11c⁺-Zellen separiert. Die Zellen wurden anschließend zur Bestimmung der mRNA in RLT-Puffer aufgenommen.

Tab. 5: In dieser Arbeit verwendete monoklonale Antikörper.

Antikörper	Klon	Isotyp
FITC α -mouse CD40	3/23	Ratte IgG _{2a}
FITC α -mouse CD3 ϵ	145-2C11	Armenischer Hamster IgG ₁ , κ
FITC α -mouse CD49b/Pan-NK	DX5	Ratte IgM, κ
FITC α -mouse CD19	1D3	Ratte IgG _{2a}
PE α -mouse CD11c	HL3	Armenischer Hamster IgG ₁ , λ
PE α -mouse TNF- α	MP6-XT22	Ratte IgG ₁
PE α -mouse IFN- γ	XMG1.2	Ratte IgG ₁
PE α -mouse IL-17	TC11-18H10.1	Ratte IgG ₁ , κ
PE α -mouse IL-6	MP5-20F3	Ratte IgG ₁
PE α -mouse IL-10	JES5-16E3	Ratte IgG _{2b}
PE α -mouse IL-4	11B11	Ratte IgG ₁
PE α -mouse CD25	PC61	Ratte IgG ₁ , λ
PE α -mouse CD103	M290	Ratte IgG _{2a} , κ
PE α -mouse CD62L	MEL-14	Ratte IgG _{2a} , κ
Biotin α -mouse CD80	16-10A1	Armenischer Hamster IgG ₂ , κ
Biotin α -mouse CD86	GL1	Ratte IgG _{2a} , κ
Biotin α -mouse I-A ^b	AF6-120.1	Maus IgG _{2a} , κ
Biotin α -mouse CD40	3/23	Ratte IgG _{2a} , κ
Biotin α -mouse CCR7	4B12	Ratte IgG _{2a}
Biotin α -mouse CD69	H1.2F3	Armenischer Hamster IgG ₁ , λ
Biotin α -mouse CD44	IM7	Ratte IgG _{2b} , κ
APC α -mouse CD45R/B220	RA-6B2	Ratte IgG _{2a} , κ
APC α -mouse CD11b	M1/70	Ratte IgG _{2b} , κ
APC α -mouse CD4	RM4-5	Ratte IgG _{2a} , κ
APC α -mouse CD11c	HL3	Armenischer Hamster IgG ₁ , λ 2

2.6.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung in T-Zellen und dendritischen Zellen in der Lamina propria

Für die intrazelluläre Färbung der T-Zellen wurden die Leukozyten aus dem Gesamtdarm *B. vulgatus*-monokolonisierter und SPF-kolonisierte *IL-2^{-/-}*-Mäuse isoliert und in einer 24-Lochplatte 1 x 10⁶ Zellen in 1 ml Verdaumedium (RPMI 1640, 5 % FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 µM β-Mercaptoethanol) ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit *para*-Methoxyamphetamin (PMA; 50 ng/ml; Sigma) und Ionomycin (500 ng/ml; Sigma) stimuliert. Um zu verhindern, dass die produzierten Zytokine der T-Zellen ins Medium sezerniert werden, wurde Golgistop (2 nM Monensin, BD PharMingen) zugegeben und für 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeerntet und eine FACS-Färbung mit mAK gegen CD4 (APC) und CD3ε (FITC) (beide BD PharMingen,) durchgeführt.

Die LP-DCs wurden, ohne zusätzliche Stimulation, direkt nach der Isolation aus dem Darm mit anti-CD11c (APC) (BD PharMingen) gefärbt.

LP-T-Zellen und LP-DCs wurden zweimal mit PBS / 1 % FCS gewaschen, zur Fixierung der Zellen in 100 µl Cytifix / Cytoperm (BD Pharmingen) resuspendiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit einem Perm/Wash Puffer (0,1 % Saponin (Sigma) und 3 % FCS in PBS) wurden die T-Zellen mit mAk gegen TNF-α (PE), IFN-γ (PE), IL-17 (PE), IL-10 (PE) und IL-4 (PE) für 30 min bei 4°C inkubiert. Dendritische Zellen wurden mit mAk gegen IL-6 (PE) oder TNF-α (PE) (alle Ak von BD Pharmingen) gefärbt. Alle verwendeten Antikörper wurden in einer 1:50 Verdünnung in Perm/Wash Puffer eingesetzt. Dabei dient das im Perm/Wash Puffer enthaltene Saponin zur Permeabilisierung der Zellmembranen, wodurch die Antikörper in das Zellinnere eindringen können. Überschüssige Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit Perm/Wash Puffer entfernt. Es wurde noch einmal mit PBS / 1 % FCS gewaschen und die Zellen dann in 50 µl PBS / 1 % FCS und 30 µl PFA (4 % in PBS) für die FACS-Analyse aufgenommen.

2.7 Histopathologie und anti-CD11c Färbung

2.7.1 Histopathologie

Aus *IL-2^{-/-}*-Mäusen wurden verschiedene Gewebestücke aus dem Darm entnommen, (Kolon ascendens und terminales Ileum) gesäubert und in Tissue-Tek O.C.T (Sakura) bei -80°C aufbewahrt. Für immunhistologische Versuche wurden aus den Geweben 5 µm dicke

Schnitte durch ein Kryostat (Leica CM3050S) angefertigt, und die Objektträger anschließend bei -80°C eingefroren.

2.7.2 Anti-CD11c Färbung

Die tiefgefrorenen Schnitte wurden 2,5 min in eiskaltem Methanol (Merck) fixiert und anschließend 1 h lang getrocknet. Nach der Umrandung des Schnittes durch einen Pap Pen wurden die Objektträger für 10 min in Mg^{2+} und Ca^{2+} haltigem PBS (Gibco) gewaschen. Um Bindungen des sekundären Antikörpers an eventuell bereits vorhandenes endogenes Biotin zu vermeiden, bzw. um die Detektion von endogenem Avidin zu verhindern, wurden die Schnitte zuerst mit einem Blocking Kit (Vector laboratories) behandelt. Dabei wird mit einer ersten Komponente endogenes Avidin und mit einer zweiten Komponente endogenes Biotin abgeblockt. Dazu wurde ein Tropfen der Avidin Komponente auf jeden Schnitt aufgetragen, 25 min bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal 3 min in Mg^{2+} und Ca^{2+} haltigem PBS gewaschen. Danach wurde die Biotin Komponente wie die Avidin Komponente angewendet. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern, wurde mit 1:100 in PBS / 10 % PBS verdünntem Fc-Block (BD Pharmingen) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Primärantikörper wurde biotinierter anti-mouse CD11c Antikörper, oder der Isotyp (armenischer Hamster IgG) eingesetzt (beide von BD Pharmingen, 1:100 in PBS / 10 % PBS verdünnt) und bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach Abwaschen des überschüssigen Antikörpers (dreimal je 5 min in Mg^{2+} und Ca^{2+} haltigem PBS) wurde mit 1:500 in PBS / 10 % PBS verdünntem sekundärem Antikörper Streptavidin Alexa Fluor 594 (Molecular probes) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 fünfminütigen Waschschrritten wurde die Färbung der Kerne mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) ($1\ \mu\text{g}/\text{ml}$) für 5 min bei RT im Dunkeln durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit Mg^{2+} und Ca^{2+} haltigem PBS wurden die Schnitte in Fluoprep (bioMérieux) eingebettet und die Deckgläser mit Entellan (Merck) versiegelt.

2.8 Statistik

Zur statistischen Auswertung erfolgte eine Datenbewertung zweier Gruppen über den Student t-Test, während eine Datenbewertung mehrerer Gruppen über den ONE-Way-ANOVA (Posttest Bonferroni) Test ermittelt wurde. Die Differenz von Werten mit $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant beurteilt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung dendritischer Zellen in der Lamina Propria

E. coli-monokolonisierte IL-2-defiziente Mäuse entwickeln im Alter von 20-33 Wochen eine Kolitis, während *B. vulgatus*-monokolonisierte Mäuse gesund bleiben. Zudem verhindert *B. vulgatus* in *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierten Mäusen eine *E. coli*-induzierte Kolitis. WT-Mäuse bleiben unabhängig von ihrer Kolonisierung gesund (Waidmann *et al.* 2003). In *IL-2*^{-/-}-Mäusen ist die Induktion der Kolitis durch eine Dysregulation der T-Zell-Reifung (Malek *et al.* 2002; Wolf *et al.* 2001) mit nachfolgender, überschießender Th1-Antwort bedingt (Ehrhardt *et al.* 1997; Sadlack *et al.* 1995; Simpson *et al.* 1995; Strober *et al.* 2002).

Dendritische Zellen spielen bei der Entstehung von Entzündungen durch die Aktivierung und Regulation von T-Zellen eine entscheidende Rolle. Mit Hilfe des gnotobiotischen, IL-2-defizienten Mausmodells sollte untersucht werden, ob dendritische Zellen in der Lamina propria (LP-DCs) durch kommensale Bakterien (*E. coli* und *B. vulgatus*) *in vivo* unterschiedlich moduliert werden und dadurch zu einer unterschiedlichen Stimulation naiver T-Zellen führen.

Es wurden LP-DCs aus *E. coli*- und *B. vulgatus*-monokolonisierten, sowie aus *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierten Tieren isoliert und mittels FACS analysiert. Als Referenztiere zu den gnotobiotischen Tieren dienten Mäuse aus SPF-Haltung, die bereits nach 10-15 Wochen an einer Kolitis erkranken und keimfreie Mäuse, die, wie *B. vulgatus*-monokolonisierte Tiere, gesund bleiben. In dieser Arbeit wurde die Modulation dendritischer Zellen in der Lamina Propria (LP-DCs) vor Auftreten der Kolitis untersucht. Dies hat den Vorteil frühzeitige immunologische Veränderungen zu erfassen, die zur Kolitisentwicklung führen. Eine Aktivierung dendritischer Zellen durch den Entzündungsprozess kann dabei ausgeschlossen werden. Zur Untersuchung der LP-DCs wurden 14-16 Wochen alte Tiere verwendet. In diesem Alter zeigen *E. coli*-monokolonisierte Tiere noch keine histologischen Anzeichen einer Kolitis (Waidmann *et al.* 2003), während SPF-kolonisierte Referenz-Mäuse bereits erkrankt sind. Die Charakterisierung der DCs fand auch in WT-Mäusen statt, um eventuell vorhandene Einflüsse des Genotyps zu erfassen.

3.1.1 Expression der Aktivierungsmarker auf Lamina propria-dendritischen Zellen

Die Funktion dendritischer Zellen besteht in der Antigenaufnahme und der anschließenden Präsentation des Antigens an Lymphozyten. Sobald immature DCs Antigene aufnehmen, oder durch körpereigene immunologische Signale stimuliert werden, durchlaufen sie einen Reifungsprozess. Im Verlauf dieses Prozesses werden Rezeptoren zur Antigenaufnahme herunterreguliert, während die zur Antigenpräsentation wichtigen MHC-Klasse-II und kostimulatorischen Moleküle (CD40, CD80 und CD86) vermehrt exprimiert werden (Banchereau *et al.* 2000; Banchereau & Steinman 1998). Die Untersuchung der Expressionmarker dient daher zur Bestimmung des Maturations- und Aktivierungszustandes dendritischer Zellen. In dieser Arbeit wurden Leukozyten aus dem Gesamtdarm isoliert und die CD11c⁺-Zellen mittels FACS auf die Expression von CD40, CD80, CD86 und MHC-Klasse-II untersucht. Bei der Auswertung wurden T-, NK- und B-Zellen durch monoklonalen Antikörper (mAk) gegen ihre spezifischen Marker CD3ε, DX5 und CD19 ausgeschlossen und nur CD11c⁺-Zellen berücksichtigt.

Unabhängig von der Kolonisierung waren in allen *IL-2*^{-/-}- und WT-Mäusen zwei CD11c⁺-Populationen zu erkennen (Abb. 3), die im Weiteren als CD11c^{int} (R1) und CD11c^{hi} (R2) bezeichnet werden. Neben diesen beiden Populationen konnte noch eine kleine Population CD11c^{int}CD11b^{hi}-Zellen identifiziert werden. Bei dieser Population handelt es sich um Makrophagen (Krajina, persönliche Übermittlung), die in die Auswertung nicht mit einbezogen wurden.

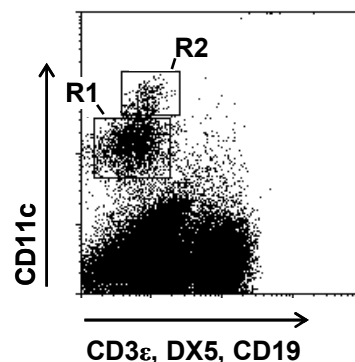


Abb. 3: CD11c⁺-Populationen im Gesamtdarm von *IL-2*^{-/-}- und WT-Mäusen. Aus dem Gesamtdarm der Mäuse wurden Leukozyten isoliert und die DCs mit anti-CD11c (PE) gefärbt. T-, NK- und B-Zellen wurden durch monoklonalen Antikörper (mAk) gegen anti-CD3ε, anti-DX5 und mit anti-CD19 (alle FITC) von der Auswertung ausgeschlossen.

3.1.1.1 Expression von Aktivierungsmarkern auf CD11c^{int} Zellen (R1)

Die Untersuchung der CD11c^{int}-Zellen in *IL-2*^{-/-}-Mäusen zeigte eine deutliche Erhöhung der Aktivierungsmarker CD40, CD80 und CD86 in SPF- und *E. coli*-kolonisierten Mäusen im Vergleich zu *B. vulgatus*-monokolonisierten, *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien Mäusen. Die MHC-Klasse-II Expression auf LP-DCs war dagegen in allen Mausgruppen hochreguliert, wobei in SPF- und *E. coli*-kolonisierten Tieren die Expression tendenziell etwas geringer war als in den anderen Versuchsgruppen (Abb. 4).

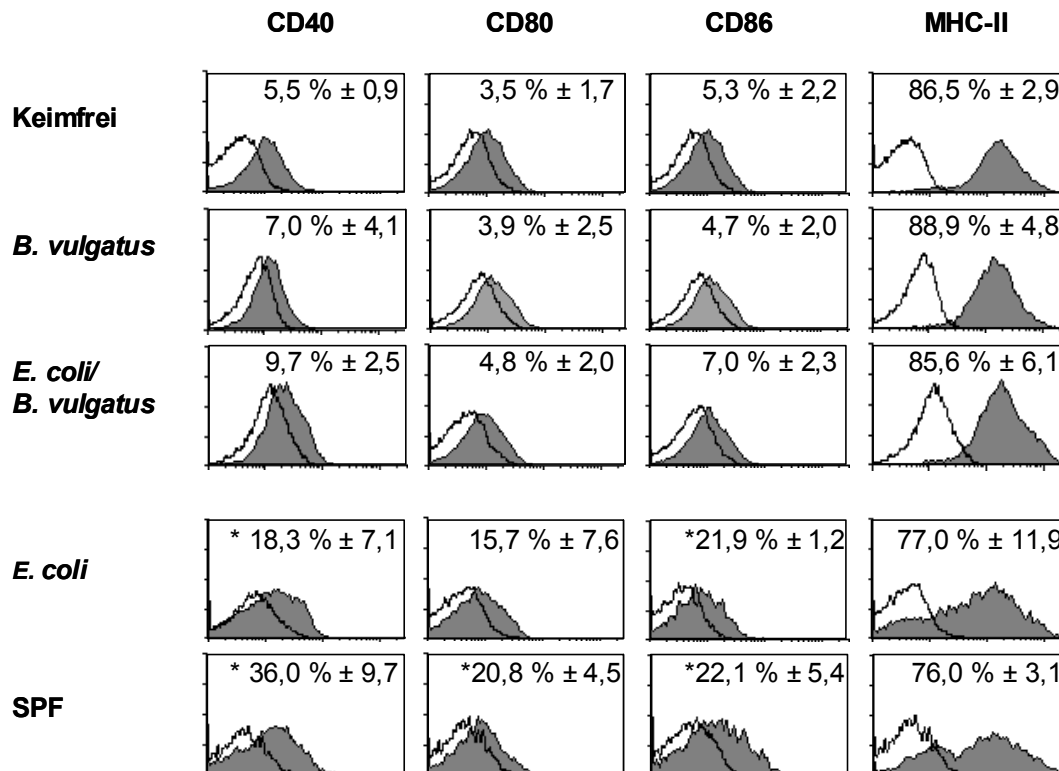


Abb. 4: Expression der Aktivierungsmarker auf LP-DCs in *IL-2*^{-/-}-Mäusen. Leukozyten wurden aus dem Gesamtdarm der unterschiedlich kolonisierten *IL-2*^{-/-}-Mäuse isoliert, mit anti-CD11c (PE), anti-CD3ε, anti-DX5, anti-CD19 (alle FITC) und mit mAk gegen die Aktivierungsmarker (PercP) (gefüllte graue Linie), oder dem Isotyp (PercP) (schwarze Linie) gefärbt und bezüglich der Aktivierungsmarker untersucht. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von drei-neun Tieren pro Gruppe. Die Zahlen geben den Anteil positiver Zellen in Prozent an ± Stabw. * p < 0,05 im Vergleich zu *B. vulgatus*-monokolonisierten, *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien Mäusen. SPF = spezifisch-pathogenfrei.

Die erhöhten Aktivierungsmarker (CD40^{hi}CD86^{hi}MHC-II^{hi}) *E. coli*- und SPF-kolonisierter *IL-2*^{-/-}-Mäuse weisen auf einen aktivierten Zustand der LP-DCs hin. Dagegen zeigen LP-DCs *B. vulgatus*-monokolonisierter, *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierter und keimfreier Tiere weder einen aktivierten noch immaturren Zustand (CD40^{lo}CD86^{lo}MHC-II^{hi}), der in dieser Arbeit im Weiteren als semi-maturer Zustand bezeichnet wird.

In WT-Mäusen war die Expression der Aktivierungsmarker auf LP-DCs geringer als auf *IL-2^{-/-}*-LP-DCs. *E. coli*- und SPF-kolonisierte WT-Mäuse zeigten jedoch, wie *IL-2^{-/-}*-Mäuse, eine leichte Erhöhung der CD40 Expression auf LP-DCs im Vergleich zu *B. vulgatus*-monokolonisierten, *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien Tieren. Die Aktivierungsmarker CD80 und CD86 waren in allen Gruppen kaum exprimiert (Abb. 5).

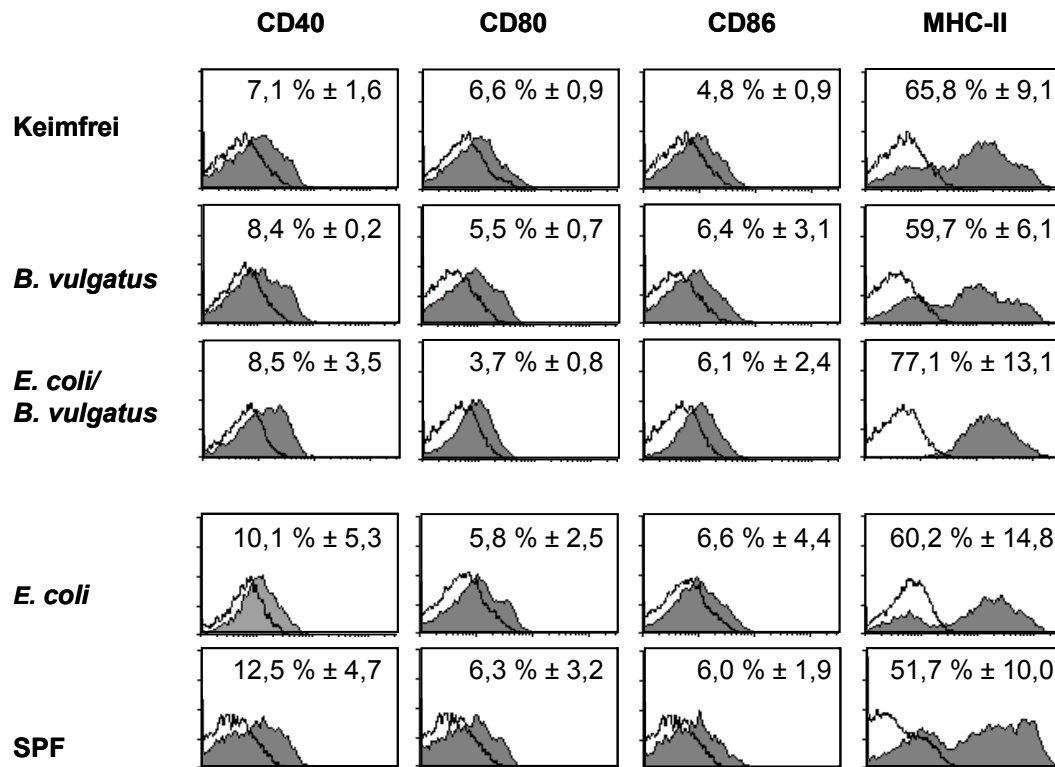


Abb. 5: Expression der Aktivierungsmarker auf LP-DCs in WT-Mäusen. Leukozyten wurden aus dem Gesamtdarm der unterschiedlich kolonisierten WT Mäuse isoliert, mit anti-CD11c (PE), anti-CD3 ϵ , anti-DX5, anti-CD19 (alle FITC) und mit mAk der Aktivierungsmarker (PercP) (gefüllte graue Linie), oder mit dem entsprechenden Isotyp (PercP) (schwarze Linie) gefärbt und bezüglich der Aktivierungsmarker untersucht. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von drei-sechs Tieren pro Gruppe. Die Zahlen geben den Anteil positiver Zellen in Prozent an \pm Stabw. SPF = spezifisch-pathogenfrei.

3.1.1.2 Expression von Aktivierungsmarkern auf CD11c^{hi}-Zellen (R2)

Bei der Untersuchung von CD11c^{hi}-Zellen (R2) konnte weder in den unterschiedlich kolonisierten *IL-2^{-/-}*-Mäusen noch im Vergleich zu WT-Mäusen ein signifikanter Unterschied bezüglich der Aktivierungsmarker gefunden werden (Abb. 6). Die CD40-Expression lag bei allen Gruppen ungefähr bei 40 % positiver DCs. Die Aktivierungsmarker CD80 und CD86 waren dagegen in den verschiedenen Tieren relativ gering exprimiert, mit Ausnahme der SPF-Tiere, die sowohl CD80 als auch CD86 etwas stärker exprimierten. Nahezu 100 % der CD11c⁺-Zellen exprimierten in den unterschiedlichen Mausgruppen MHC-Klasse-II.

Die vermehrte Expression von CD40 und MHC-Klasse-II auf den CD11c^{hi}-Zellen deutet auf eine kleine, bereits aktivierte, Zellpopulation hin.

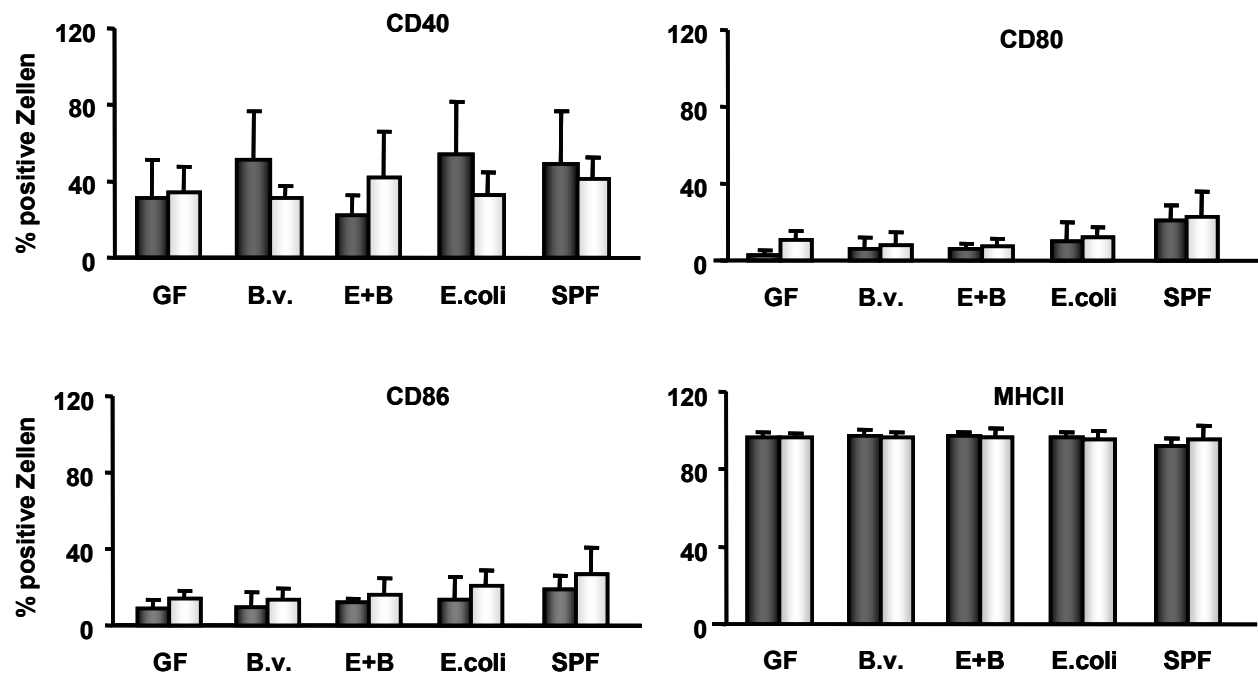


Abb. 6: Expression der Aktivierungsmarker auf CD11c^{hi}-Zellen in der Lamina propria. Leukozyten wurden aus Mäusen isoliert, mit anti-CD11c (PE), anti-CD3 ϵ , anti-DX5, anti-CD19 (alle FITC) und dem jeweiligen mAk der Aktivierungsmarker gefärbt (PercP) und CD11c^{hi}-Zellen mittels FACS auf die Expression der Aktivierungsmarker CD40, CD80, CD86 und MHC-II untersucht. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei-neun Tieren pro Gruppe \pm Stabw. ■KO □WT, GF = keimfrei, B.v. = *B. vulgatus* mpk, E+B = *E. coli* mpk/B. *vulgatus* mpk, E.coli = *E. coli* mpk, SPF = spezifisch-pathogenfrei.

3.1.2 Dendritische Zell-Subpopulationen in der Lamina propria

Zur Familie der DCs gehören verschiedene CD11c⁺-Zell-Subpopulationen, die bezüglich ihrer exprimierten Oberflächenmoleküle und ihrem Aufenthaltsort eingeteilt werden. Es ist bekannt, dass die einzelnen Subpopulationen spezifische Funktionen ausführen (Ardavin 2003; Banchereau *et al.* 2000; Shortman & Naik 2007; Shortman & Liu 2002). Bei Infektionen oder Entzündungen treten vermehrt spezielle DC-Subpopulation auf (Liu 2005; O'Keeffe *et al.* 2002). In der murinen Lamina propria wurden bisher vier Subpopulationen beschrieben, die anhand der Expression von CD11c, CD11b, B220, CD8 und CD4 unterschieden werden: (i) CD11c⁺CD11b⁺CD8 α ⁻CD4⁻ (= myeloide DC, mDC), (ii) CD11c⁺CD11b⁻CD8 α ⁻CD4⁻, (iii) CD11c⁺CD11b⁻CD8 α ⁺CD4⁻ und CD11c^{int}B220⁺CD11b⁻CD8 α ^{-/+} (= plasmazytoide DC; pDC) (Iwasaki 2007; Johansson & Kelsall 2005; Kelsall & Leon 2005). Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die unterschiedliche Kolonisierung der

Mäuse einen Einfluss auf die Verteilung der DC-Subpopulationen hat. Da alle vier beschriebenen Subpopulationen keine CD4-Expression zeigen, wurden die DC-Subpopulationen in dieser Arbeit durch die Expression von CD11c, CD11b, B220 und CD8 bestimmt.

In allen *IL-2*^{-/-}- und WT-Mausgruppen wurden hauptsächlich CD11c⁺CD11b⁺CD8 α ⁻CD4⁻ (= myeloide DC; mDCs) (~71,3 %) und nur wenige CD11c^{int}B220⁺CD11b⁻CD8 α ⁻ (= plasmazytoide DCs; pDCs) (~10,7 %) gefunden (Abb. 7). CD11c⁺CD8⁺-DCs (~0,5 %) waren nur in sehr geringer Anzahl vorhanden. Außerdem konnte noch eine zusätzliche CD11c^{hi}CD11b⁺-Population (= R2) (~16,1 %) beobachtet werden.

Die Kolonisierung hatte keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der DC-Subpopulationen in *B. vulgatus*-monokolonisierten, *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien *IL-2*^{-/-}-Mäusen. In *E. coli*- und SPF-kolonisierten Tieren hingegen zeigte sich ein erhöhter Anteil pDCs (Tab. 6).

Tab. 6: Prozentualer Anteil der Subpopulationen an der DC-Gesamtpopulation. Isolierte Leukozyten aus dem Gesamtdarm wurden mit anti-CD11c (PE), anti-CD3 ϵ , anti-DX5, anti-CD19 (alle FITC) und zusätzlich mit den Oberflächenmarkern CD11b für mDC und CD45R/B220 für pDC (beide APC) gefärbt und mit FACS analysiert. Zahlen geben den prozentualen Anteil der Subpopulationen an der CD11c⁺-Population an. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens sechs Tieren pro Gruppe. SPF = spezifisch-pathogenfrei.

Kolonisierung der <i>IL-2</i> ^{-/-} -Mäuse	Myeloide DC (CD11c ⁺ CD11b ⁺)	Plasmazytoide DC (CD11c ⁺ B220 ⁺)
	% CD11c ⁺ Zellen	% CD11c ⁺ Zellen
Keimfrei	75,0 ± 0,8	10,1 ± 3,9
<i>B. vulgatus</i>	71,3 ± 3,8	11,0 ± 4,6
<i>E. coli</i> / <i>B. vulgatus</i>	68,0 ± 6,5	9,4 ± 4,2
<i>E. coli</i>	62,5 ± 12,6 ^{b)}	13,1 ± 4,1
SPF	50,7 ± 8,0 ^{a)}	19,9 ± 7,0 ^{c)}

^{a)} p < 0,05 im Vergleich zu *B. vulgatus*-monokolonisierten, *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien Tieren.

^{b)} p < 0,05 im Vergleich zu keimfreien Tieren.

^{c)} p < 0,05 im Vergleich zu *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien Tieren.

Die prozentuale Zusammensetzung der DC-Subpopulationen war in den WT-Mäusen vergleichbar zu der Zusammensetzung in *IL-2*^{-/-}-Mäusen. Ein Anstieg der pDCs konnte auch in WT-Mäusen in *E. coli*- und SPF-kolonisierten Tieren beobachtet werden.

3.1.3 Lokalisierung dendritischer Zellen in der Lamina propria

Um die Lokalisierung CD11c⁺-Zellen im Kolon und terminalen Ileum von *IL-2*^{-/-}-Mäusen zu untersuchen, wurden Schnitte aus Darmgewebe angefertigt und mit biotinierten mAk gegen CD11c und anschließendem sekundären Antikörper (Alexa 594) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. CD11c⁺-Zellen wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes analysiert (Abb. 7).

Im Kolon konnten unabhängig von der Kolonisierung nur sehr wenige CD11c⁺-Zellen nachgewiesen werden, die hauptsächlich in lymphassozierten Follikeln angeordnet waren. Dagegen wurden in der Lamina propria des terminalen Ileums deutlich mehr CD11c⁺-Zellen angefärbt. Aufgrund der unterschiedlichen Zottenform im Darmgewebe der Mäuse kann allerdings keine eindeutige Aussage zur Anzahl der CD11c⁺-Zellen getroffen werden.

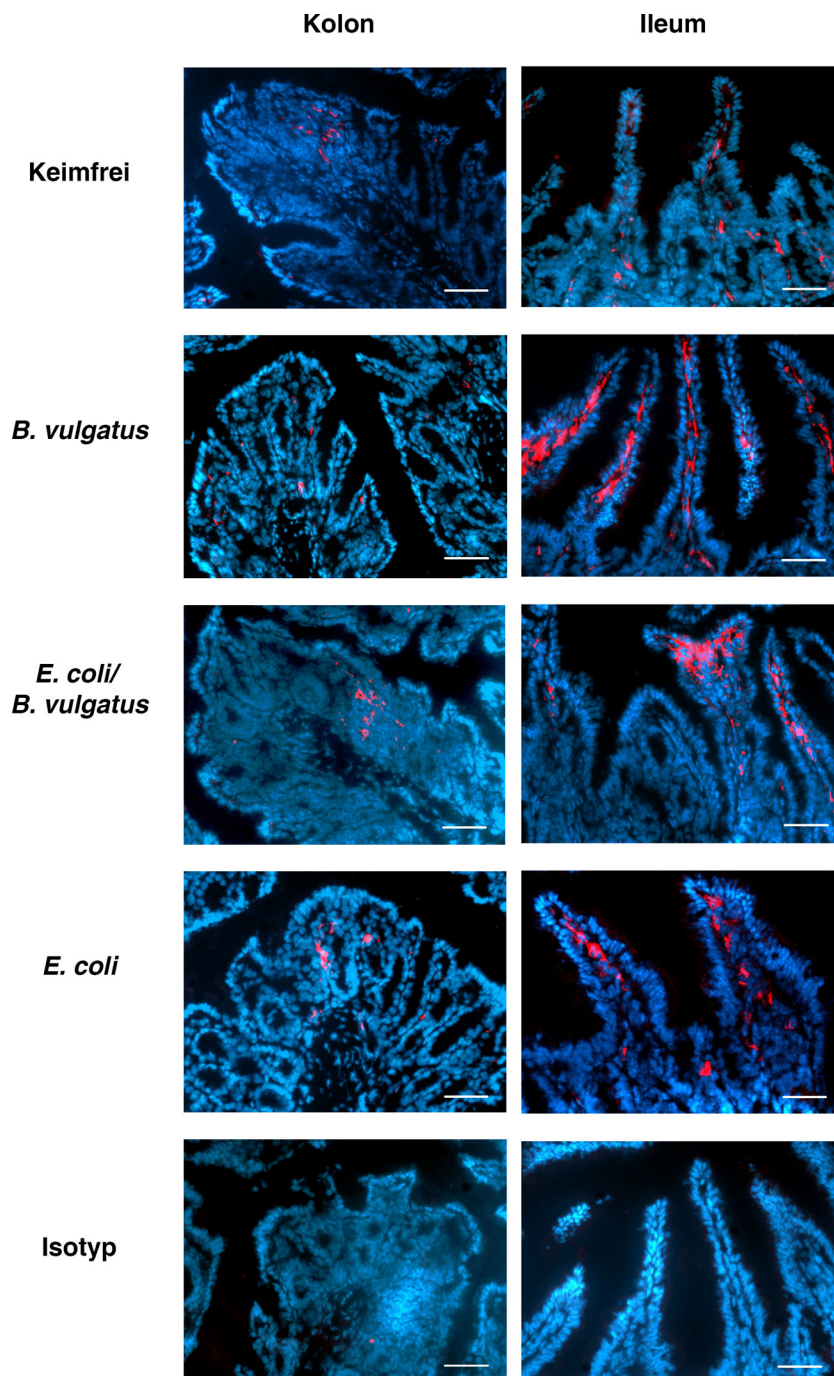


Abb. 7: Lokalisierung dendritischer Zellen im Kolon und terminalen Ileum von *IL-2^{-/-}*-Mäusen. Aus verschiedenen kolonisierten *IL-2^{-/-}*-Mäusen wurden mittels Immunofluoreszenz $CD11c^{+}$ -Zellen analysiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Schnitt aus drei analysierten Tieren pro Gruppe. Blau (DAPI): Zellkerne, rot (Alexa 594): $CD11c^{+}$ -Zellen. Längsbalken entspricht 30 μm .

3.1.4 Anzahl dendritischer Zellen in der Lamina propria

Zur Bestimmung der Anzahl Lamina propria-dendritischer Zellen (LP-DCs) *E. coli*-, *B. vulgatus*-monokolonisierter, *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierter und SPF-kolonisierter, sowie keimfreier Mäuse wurden Leukozyten aus der Lamina propria isoliert und die Zellzahl

ermittelt. Anschließend wurden die prozentualen Anteile dendritischer Zellen an der Gesamtleukozytenzahl und die absolute Anzahl dendritischer Zellen bestimmt.

Aus SPF-kolonisierten *IL-2^{-/-}*-Mäusen, die bereits an Kolitis erkrankt waren, konnten durchschnittlich $5,0 \pm 2,4 \times 10^7$ Zellen isoliert werden. Dagegen wurden aus dem Gesamtdarm aller anderen Mausgruppen durchschnittlich $\sim 1,4 \times 10^7$ Leukozyten isoliert (Tab. 7).

Der prozentuale Anteil der CD11c^{int}-Population (R1) an der Leukozytenzahl lag bei 1-3 %. Die kleine CD11c^{hi}-Population (R2) machte ungefähr 0,3 % der Leukozyten aus. In *E. coli*-monokolonisierten und SPF-kolonisierten *IL-2^{-/-}*-Mäusen konnte im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen ein signifikant reduzierter Anteil CD11c⁺-Zellen an der Gesamtleukozytenzahl gezeigt werden (~ 1 % versus $\sim 2,5$ -3,5 %) (Abb. 9; Tab. 6).

Auch WT-Mäuse zeigten in *E. coli*- und SPF-kolonisierten Tieren im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen eine Reduktion des prozentualen Anteils CD11c⁺-Zellen (Abb. 8).

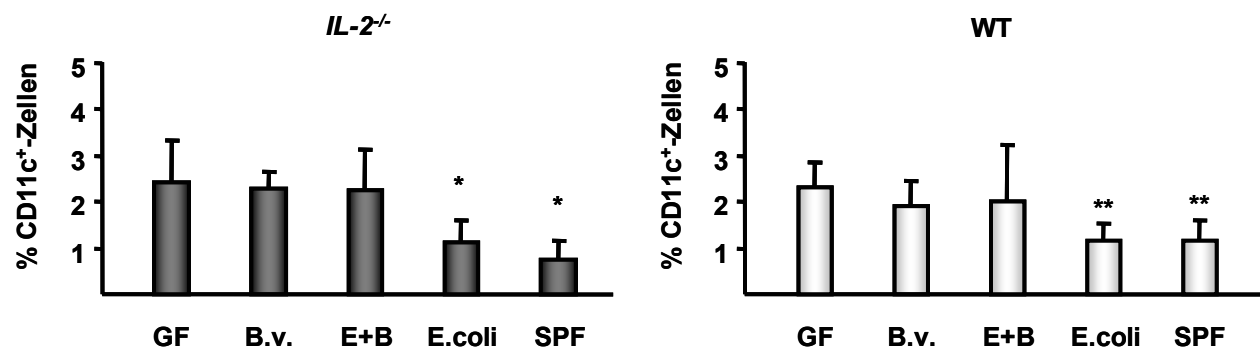


Abb. 8: Prozentualer Anteil CD11c⁺-Zellen im Gesamtdarm von *IL-2^{-/-}*- und WT-Mäusen. Aus dem Gesamtdarm der Mäuse wurden Leukozyten isoliert und mittels FACS der prozentuale Anteil CD11c⁺-Zellen bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens drei Tieren pro Gruppe \pm Stabw. * $p < 0,05$ im Vergleich zu *B. vulgatus*-monokolonisierten, *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien Mäusen; ** $p < 0,05$ im Vergleich zu *B. vulgatus*-monokolonisierten und keimfreien Mäusen ■ KO □ WT, GF: keimfrei, B.v.: *B. vulgatus* mpk, E+B: *E. coli* mpk/*B. vulgatus* mpk, E.coli: *E. coli* mpk, SPF: spezifisch-pathogenfrei.

Da die untersuchten Mäuse eine unterschiedliche Anzahl an Leukozyten in der Lamina propria zeigten, wurden aus den prozentualen Anteilen der LP-DCs an der Leukozytenzahl die absoluten Zahlen der CD11c⁺-Zellen berechnet.

In *E. coli*-monokolonisierten Tieren wurden $2,1 \pm 1,0 \times 10^5$ CD11c⁺-Zellen, in SPF-kolonisierten Tieren $3,3 \pm 1,9 \times 10^5$ CD11c⁺-Zellen bestimmt (Tab. 7). In *B. vulgatus*-monokolonisierten und *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierten, sowie keimfreien Tieren konnten keine deutlichen Unterschiede der absoluten Anzahl an CD11c⁺-Zellen gezeigt werden (Tab. 7).

Tab. 7: Leukozytenzahl, prozentualer Anteil CD11c⁺-Zellen an der Leukozytenzahl und absolute Zellzahl der CD11c⁺-Zellen in der Lamina propria von *IL-2*^{-/-}-Mäusen. Leukozyten wurden aus dem Gesamtdarm isoliert, die Zellzahl bestimmt und CD11c⁺-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Prozentzahlen geben den prozentualen Anteil an der Leukozytenpopulation (= 100 %) an. Für die absoluten Zellzahlen wurden die prozentualen Werte auf die gezählte Anzahl der Leukozyten bezogen. LP-DCs: Lamina propria-dendritische Zellen.

Kolonisierung der <i>IL-2</i> ^{-/-} -Mäuse	Absolute Leukozytenzahl (x 10 ⁷ Zellen)	Prozentualer Anteil LP-DCs an der Leukozytenzahl (%)	Absolute Anzahl LP-DCs (x 10 ⁵ Zellen)
Keimfrei	2,0 ± 1,0	2,4 ± 0,9	4,08 ± 3,42
<i>B. vulgatus</i>	1,1 ± 0,9	2,3 ± 0,5	4,02 ± 1,93
<i>E. coli/B. vulgatus</i>	1,2 ± 0,2	2,3 ± 0,9	3,14 ± 0,69
<i>E. coli</i>	1,5 ± 0,7	1,1 ± 0,5 ^{a)}	2,18 ± 1,16
SPF	5,0 ± 2,3 ^{b)}	0,8 ± 0,4 ^{a)}	3,31 ± 1,85

^{a)} p < 0,05 im Vergleich zu *B. vulgatus*-monokolonisierten, *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien Tieren.

^{b)} p < 0,05 im Vergleich zu *E. coli*, *B. vulgatus*-monokolonisierten, *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien Tieren. Zahlen geben Mittelwerte aus mindestens drei Tieren pro Gruppe ± Stabw an.

Zusammenfassung: Charakterisierung dendritischer Zellen in der Lamina propria

LP-DCs *E. coli*- und SPF-kolonisierter *IL-2*^{-/-}-Mäuse zeigten eine signifikante Erhöhung des Aktivierungsmarkers CD40 und eine leichte Erhöhung der Aktivierungsmarker CD80 und CD86 im Vergleich zu *B. vulgatus*-monokolonisierten, *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien Tieren. In LP-DCs *E. coli*- und SPF-kolonisierter *IL-2*^{-/-}-Mäuse liegt somit ein aktivierter und maturierter DC-Phänotyp vor, während LP-DCs *B. vulgatus*-monokolonisierter und *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierter *IL-2*^{-/-}-Mäuse zu einem semi-maturen Zustand differenzieren.

Die Bestimmung der Zellzahl LP-DCs zeigte in *E. coli*- und SPF-kolonisierten *IL-2*^{-/-}-Mäusen einen signifikant reduzierten prozentualen Anteil CD11c⁺-Zellen an der Leukozytenzahl im Vergleich zu *B. vulgatus*-monokolonisierten, *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien Tieren.

Die unterschiedlich kolonisierten WT-Mäuse zeigten sowohl hinsichtlich der Expression von Aktivierungsmarkern auf LP-DCs als auch bezüglich des prozentualen Anteils CD11c⁺-Zellen an der Leukozytenzahl tendenziell ähnliche Ergebnisse wie die entsprechend kolonisierten *IL-2*^{-/-}-Mäuse. Allerdings waren die Resultate in *IL-2*^{-/-}-Mäusen eindeutiger, weshalb in dieser Arbeit weitere Untersuchungen auf *IL-2*^{-/-}-Mäuse beschränkt wurde.

3.2 *B. vulgatus* differenziert dendritische Zellen in der Lamina propria zu einem semi-maturen Phänotyp

Lamina propria-dendritische Zellen (LP-DCs) *B. vulgatus*-monokolonisierter und *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierter *IL-2*^{-/-}-Mäuse zeigten einen besonderen DC-Phänotyp (CD40^{lo}CD86^{lo}MHC-II^{hi}), der weder aktivierten, noch immaturen DCs entspricht. In der Literatur werden DCs dieses Phänotyps bereits beschrieben und als semi-mature DCs bezeichnet (Frick *et al.* 2006). Semi-mature DCs werden nicht nur durch die geringe Expression von Aktivierungs- und Maturationsmarkern, sondern auch durch funktionelle Einschränkungen charakterisiert (Frick *et al.* 2006; Hegde *et al.* 2004). Es konnte gezeigt werden, dass semi-mature DCs eine geringe CCR7-Expression verbunden mit einem verminderten Migrationspotential und ein reduziertes T-Zell-Aktivierungspotential besitzen (Frick *et al.* 2006; Hegde *et al.* 2004).

In dieser Arbeit sollte deshalb im Weiteren untersucht werden, ob *B. vulgatus*-induzierte, semi-mature LP-DCs eine Einschränkung bezüglich der CCR7-Expression, der Migration in die mesenterialen Lymphknoten, sowie der T-Zell-Aktivierung zeigen.

3.2.1 CCR7-Expression auf dendritischen Zellen in der Lamina propria und in den mesenterialen Lymphknoten

Die Expression von CCR7 ist ein wichtiger Bestandteil der DC-Maturation. Durch diesen Oberflächenrezeptor wird die Migration der peripheren DCs in die Lymphknoten induziert (Forster *et al.* 1999; Yanagihara *et al.* 1998). CCR7 bindet an die beiden Chemokine CCL19 und CCL21, die in den T-Zell-Zonen der sekundären Lymphorgane (Baekkevold *et al.* 2001), bzw. im lymphatischen Endothel produziert werden (Banchereau & Steinman 1998; Sallusto *et al.* 1998). Reife CCR7⁺-DCs sind in der Lamina propria und, nach stattgefundenener Migration, in den mesenterialen Lymphknoten zu finden (Jang *et al.* 2006).

Um *in vivo* die Expression von CCR7 auf intestinalen DCs der Lamina propria in Abhängigkeit der mukosalen Mikroflora zu untersuchen, wurden Leukozyten aus dem Gesamtdarm und aus den Lymphknoten von *IL-2*^{-/-}-Mäusen isoliert, mit anti-CD11c und anti-CCR7 mAk gefärbt und die Expression von CCR7 durchflusszytometrisch bestimmt.

Im Darm war die CCR7-Expression Lamina propria-dendritischer Zellen (LP-DCs) unabhängig von der Kolonisierung sehr gering. Es wurden keine Unterschiede zwischen *B. vulgatus*-, *E. coli*-monokolonisierten, *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierten und SPF-kolonisierten Tieren oder keimfreien Tieren festgestellt (Abb. 9). Im Gegensatz dazu war in

den mesenterialen Lymphknoten die CCR7-Expression auf DCs *E. coli*- und SPF-kolonisierter Mäuse signifikant höher als in den anderen Versuchsgruppen (Abb. 9).

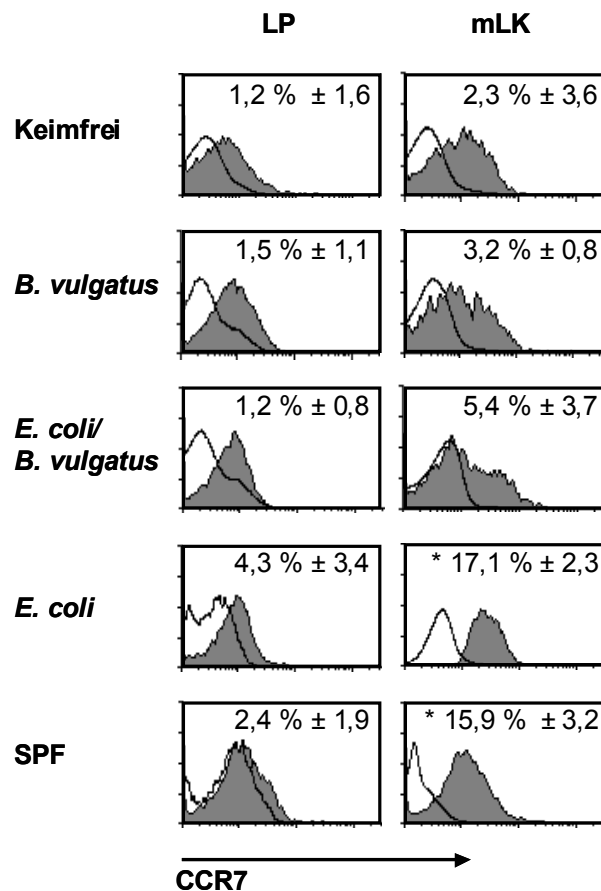


Abb. 9: CCR7-Expression auf DCs in der Lamina propria und in den mesenterialen Lymphknoten. Leukozyten wurden aus dem Gesamtdarm und aus den mesenterialen Lymphknoten isoliert, mit anti-CD11c (PE) und anti-CCR7 (APC) mAK (grau gefüllte Linie) oder mit Isotyp (APC) (schwarze Linie) gefärbt und die Expression von CCR7 durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Histogramm aus mindestens drei analysierten Tieren pro Gruppe. Die Zahlen geben den Anteil CCR7-positiver Zellen in Prozent an ± Stabw. * $p < 0,05$ im Vergleich zu *B. vulgatus*-kolonisierten, kokolonisierten und keimfreien Tieren. LP: Lamina propria; mLK: mesenteriale Lymphknoten.

3.2.2 Charakterisierung dendritischer Zellen in den mesenterialen Lymphknoten

Als Nächstes sollte untersucht werden, ob *B. vulgatus*-induzierte, semi-mature LP-DCs, vergleichbar mit den bereits beschriebenen semi-maturen DCs (Hegde *et al.* 2004), ein vermindertes Migrationspotential aufweisen. Um das Migrationspotential Lamina propria-dendritischer Zellen (LP-DCs) aus den unterschiedlich kolonisierten *IL-2^{-/-}*-Mäusen zu untersuchen, wurden DCs der mesenterialen Lymphknoten anhand ihrer Aktivierungsmarker und ihrer Zellzahl analysiert.

3.2.2.1 Expression der Aktivierungsmarker auf dendritischen Zellen in den mesenterialen Lymphknoten

Um die Aktivierung und Maturation dendritischer Zellen in den mesenterialen Lymphknoten zu untersuchen, wurden die Lymphknoten entnommen, die Leukozyten isoliert und die Expression von CD40 und MHC-Klasse-II auf CD11c⁺-Zellen mittels FACS bestimmt. Bei der Auswertung wurden T-, NK- und B-Zellen durch die Verwendung von mAk gegen CD3ε, DX5 und CD19 ausgeschlossen und nur CD11c⁺-Zellen berücksichtigt.

Im Gegensatz zur Lamina propria war in den mesenterialen Lymphknoten eine einheitliche CD11c⁺-Population zu sehen (Abb. 10A). Bei der Untersuchungen der Aktivierungsmarker in den unterschiedlichen Gruppen der *IL-2*^{-/-}-Mäuse waren keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. Die Expression von CD40 auf dendritischen Zellen in den mesenterialen Lymphknoten (mLK-DCs) lag in allen Gruppen bei ungefähr 50 %, MHC-II exprimierten ca. 80 % der mLK-DCs (Abb. 10B).

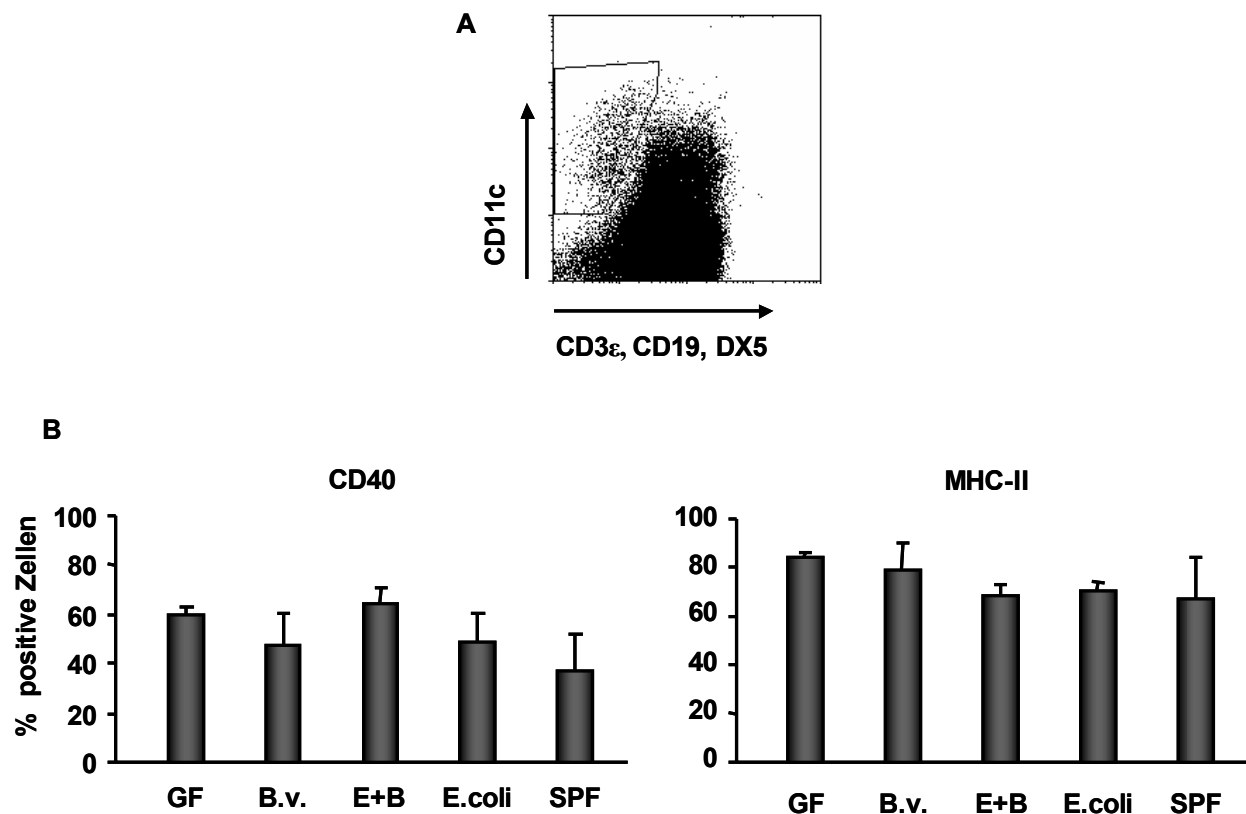


Abb. 10: Expression der Aktivierungsmarker auf DCs in den mesenterialen Lymphknoten. mLKs wurden aus *IL-2*^{-/-}-Mäusen entnommen, die Leukozyten isoliert und die Zellen mit anti-CD11c (PE), anti-CD3ε, anti-DX5, anti-CD19 (alle FITC) sowie mit den Aktivierungsmarkern CD40, oder MHC-II, (beide PercP) oder dem Isotyp (PercP) gefärbt und mittels FACS analysiert. A) CD11c⁺-Population in den mesenterialen Lymphknoten. B) Expression der Aktivierungsmarker CD40 und MHC-II auf CD11c⁺-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens drei analysierten Tieren pro Gruppe ± Stabw. GF: keimfrei, B.v.: *B. vulgatus* mpk, E+B: *E. coli* mpk/*B. vulgatus* mpk, E.coli: *E. coli* mpk, SPF: spezifisch-pathogenfrei.

3.2.2.2 Zellzahl und Subpopulationen dendritischer Zellen in den mesenterialen Lymphknoten

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die Anzahl CD11c⁺-Zellen, oder die Verteilung der DC-Subpopulationen in den mesenterialen Lymphknoten der unterschiedlichen Versuchsgruppen unterscheiden. Dazu wurden die Lymphknoten entnommen, die Leukozyten isoliert und die Zellzahl ermittelt. Anschließend wurde die prozentuale und absolute Anzahl dendritischer Zellen, sowie die Verteilung der DC-Subpopulationen innerhalb der Gesamtleukozytenzahl bestimmt. Bei der Verteilung der DC-Subpopulationen wurden myeloide (CD11c⁺CD11b⁺) und plasmazytoide (CD11c⁺B220⁺) DCs untersucht.

Die Anzahl der isolierten Leukozyten lag in SPF-kolonisierten Mäusen, die bereits schwere Entzündungen im Darm aufwiesen, bei $9,2 \pm 2,0 \times 10^7$ Zellen. In den anderen Versuchsgruppen konnten durchschnittlich $\sim 3,0 \times 10^7$ Zellen isoliert werden (Tab. 8).

Der prozentuale Anteil CD11c⁺-Zellen an der Leukozytenzahl betrug 0,5 – 1 %. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen kolonisierten Tieren gefunden werden (Tab. 8).

Um eventuell erhöhte Leukozytenzahlen bei der Beurteilung der prozentualen Anteile CD11c⁺-Zellen zu berücksichtigen, wurden die absoluten Zahlen CD11c⁺-Zellen berechnet. Lediglich in SPF-kolonisierten Mäusen konnte eine deutlich erhöhte Anzahl CD11c⁺-Zellen von $5,2 \pm 2,0 \times 10^5$ bestimmt werden. In den anderen Versuchsgruppen konnte unabhängig von der Kolonisierung eine ähnliche Anzahl von $\sim 1,5 \times 10^5$ CD11c⁺-Zellen beobachtet werden (Tab. 8).

Tab. 8: Leukozytenzahl, prozentualer Anteil DCs an der Leukozytenzahl und die absolute Zellzahl der CD11c⁺-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten von *IL-2^{-/-}*-Mäusen. Leukozyten wurden aus den mesenterialen Lymphknoten isoliert, die Zellzahl bestimmt und CD11c⁺-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Prozentzahlen geben den prozentualen Anteil an der Leukozytenpopulation (= 100 %) an. Für die absoluten Zellzahlen wurden die prozentualen Werte auf die gezählte Anzahl der Leukozyten bezogen. mLK-DCs: dendritische Zellen aus den mesenterialen Lymphknoten. Die Zahlen geben Mittelwerte aus mindestens drei analysierten Tieren pro Gruppe ± Stabw. an.

Kolonisierung der <i>IL-2^{-/-}</i> -Mäuse	Absolute Leukozytenzahl (x 10 ⁷ Zellen)	Prozentualer Anteil mLK-DCs an der Leukozytenzahl (%)	Absolute Anzahl mLK-DCs (x 10 ⁵ Zellen)
Keimfrei	2,8 ± 1,8	0,61 ± 0,15	1,0 ± 0,3
<i>B. vulgatus</i>	3,6 ± 1,6	0,58 ± 0,18	1,1 ± 0,2
<i>E. coli/B. vulgatus</i>	1,8 ± 2,3	0,74 ± 0,20	1,7 ± 0,5
<i>E. coli</i>	2,2 ± 1,2	0,45 ± 0,10	1,2 ± 0,5
SPF	9,2 ± 2,0 ^{a)}	0,60 ± 0,13	5,2 ± 2,0 ^{a)}

^{a)} p < 0,05 im Vergleich zu *B. vulgatus*-, *E. coli*-monokolonisierten, *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien Tieren.

Die Verteilung der DC-Subpopulationen zeigte keine Differenzen in den mesenterialen Lymphknoten zwischen den unterschiedlich kolonisierten Tieren. Die dominierende Population bildeten mDC (CD11c⁺CD11b⁺) mit ungefähr 58 % CD11c⁺-Zellen, pDC (CD11c⁺B220⁺) machten nur ca. 30 % der CD11c⁺ Zellen aus (Abb. 11).

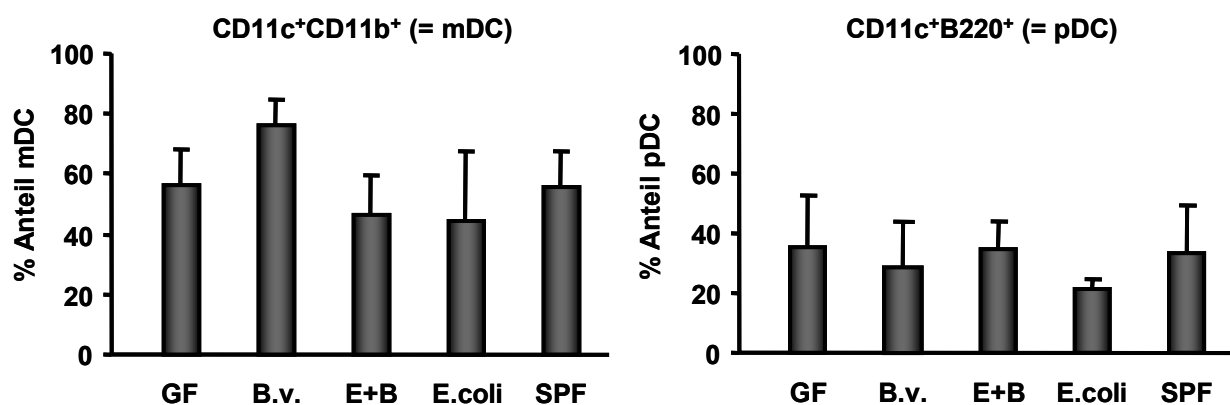


Abb. 11: Prozentualer Anteil der Subpopulationen an der DC-Gesamtpopulation in den mesenterialen Lymphknoten. Aus *IL-2^{-/-}*-Mäusen wurden die mesenterialen Lymphknoten entnommen, die Leukozyten isoliert und die Zellen mit anti-CD11c (PE), anti-CD3ε, anti-DX5, anti-CD19 (alle FITC) und zusätzlich mit den Oberflächenmarkern CD11b für mDCs und B220 für pDCs (beide APC) gefärbt und mittels FACS analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens drei analysierten Tieren pro Gruppe ± Stabw. GF: keimfrei, B.v.: *B. vulgatus* mpk, E+B: *E. coli* mpk/*B. vulgatus* mpk, E.coli: *E. coli* mpk, SPF: spezifisch-pathogenfrei.

3.2.2.3 Lokalisierung dendritischer Zellen in den mesenterialen Lymphknoten

Um die Lokalisierung und Verteilung CD11c⁺-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten zu bestimmen, wurde eine anti-CD11c Immunofluoreszenz-Färbung durchgeführt. Kryoschnitte wurden mit biotinierten monoklonalem Ak (mAk) gegen CD11c und anschließendem sekundären Antikörper (Alexa 594) gefärbt. CD11c⁺-Zellen wurden mittels eines Fluoreszenzmikroskopes analysiert.

Die Lokalisierung CD11c⁺-Zellen war in den unterschiedlich kolonisierten Tieren sehr ähnlich. Auch die Anzahl dendritischer Zellen zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen den unterschiedlich kolonisierten Gruppen (Abb. 12).

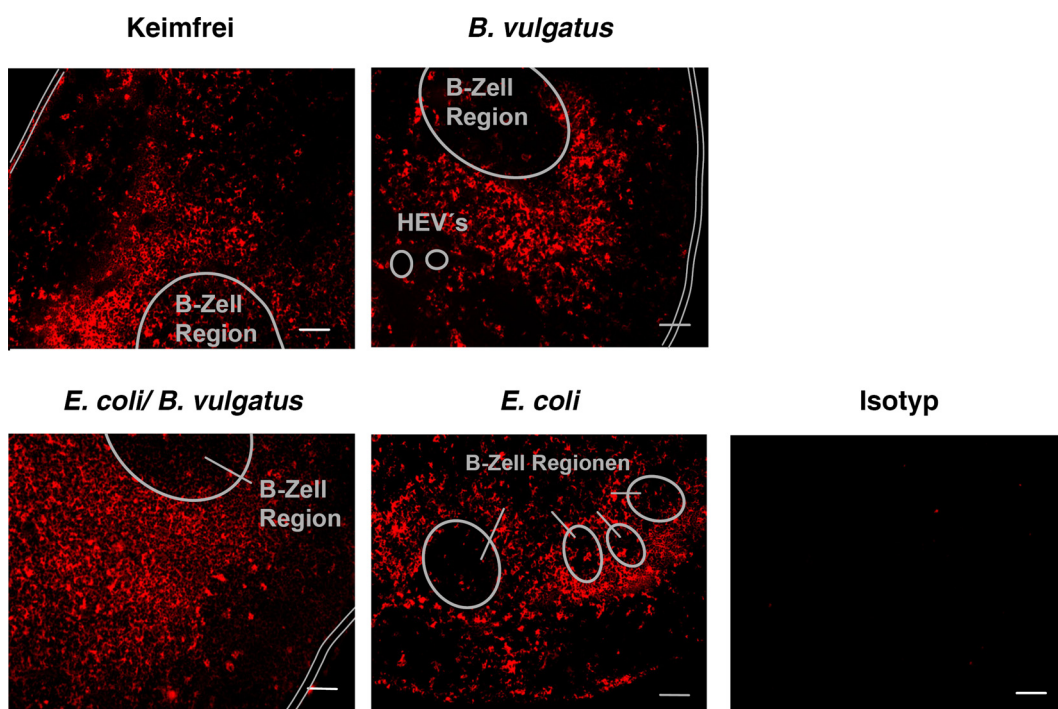


Abb. 12: Lokalisierung CD11c⁺-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten. Kryoschnitte der mesenterialen Lymphknoten aus unterschiedlich kolonisierten *IL-2*^{-/-}-Mäusen wurden mittels Immunofluoreszenz hinsichtlich CD11c⁺-Zellen analysiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Schnitt aus drei analysierten Tieren pro Gruppe. Rot (Alexa 594): CD11c⁺-Zellen. Längsbalken entspricht 30 µm. HEV's: *high endothelial venules*.

Zusammenfassung: Charakterisierung dendritischer Zellen in den mesenterialen Lymphknoten

In den unterschiedlich kolonisierten Gruppen der *IL-2*^{-/-}-Mäuse zeigten mLK-DCs keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression von Aktivierungsmarkern, des Anteils CD11c⁺-Zellen an der Leukozytenzahl, der Verteilung der DC-Subpopulationen oder der Lokalisation CD11c⁺-Zellen. Lediglich die CCR7-Expression war auf mLK-DCs *E. coli*- und

SPF-kolonisierter *IL-2^{-/-}*-Mäuse signifikant erhöht im Vergleich zu *B. vulgatus*-monokolonisierten, *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien Tieren.

3.3 Untersuchung der T-Zellen in der Lamina propria

Im Lymphknoten aktivieren und polarisieren maturierte DCs naive CD4⁺-T-Zellen (Banchereau & Steinman 1998). Je nach Aktivierungszustand der DCs werden naive T-Zellen zu Th1-, Th2- oder Th17-Zellen polarisiert. Th1-Zellen sezernieren IFN- γ und aktivieren Makrophagen, während Th2-Zellen durch die Produktion von IL-4 und IL-10 zur Aktivierung von B-Zellen führen (Murphy *et al.* 2000; Neurath *et al.* 2002). Th17-Zellen sind durch die Produktion von IL-17 und IL-23 gekennzeichnet (Bettelli *et al.* 2006; Veldhoen *et al.* 2006). Die aktivierten und polarisierten T-Zellen migrieren durch Expression verschiedener Oberflächenmarker in die Lamina propria und aktivieren dort die jeweiligen Immunzellen.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der unterschiedliche Aktivierungszustand Lamina propria-dendritischer Zellen in den Versuchsgruppen der *IL-2^{-/-}*-Mäuse einen Einfluss auf die Polarisierung naiver intestinaler T-Zellen hat. Dazu wurden Leukozyten aus dem Darm *B. vulgatus*-monokolonisierter oder SPF-kolonisierter Mäuse isoliert, mit PMA (*para*-Methoxyamphetamin) und Ionomycin stimuliert und anschließend die Expression intrazellulärer Zytokine der CD4⁺CD3⁺-Zellen (= T-Zellen) mittels FACS bestimmt.

In SPF-kolonisierten Mäusen konnten signifikant mehr CD4⁺CD3⁺-Zellen in der Lamina propria im Vergleich zu *B. vulgatus*-monokolonisierten Mäusen beobachtet werden (Abb. 14). Lamina propria-T-Zellen SPF-kolonisierter Mäuse zeigten eine erhöhte Produktion von IFN- γ und TNF- α . Zusätzlich konnte eine leicht erhöhte IL-17 Produktion beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte in Lamina propria T-Zellen *B. vulgatus*-monokolonisierter Mäuse weder IFN- γ , TNF- α , IL-17 noch IL-10 oder IL-4 nachgewiesen werden (Abb. 13).

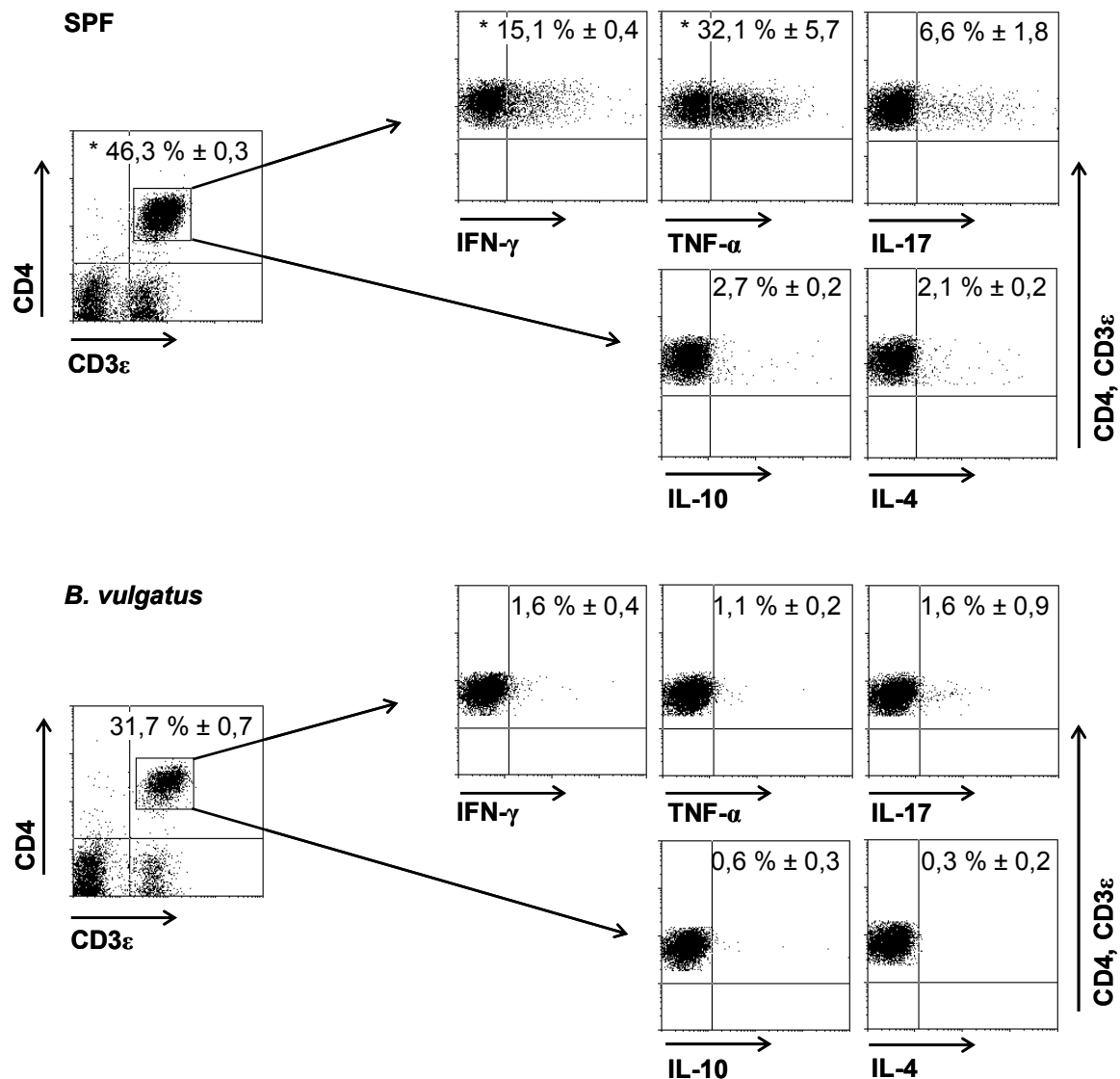


Abb. 13: Intrazelluläre Zytokinfärbung der T-Zellen in der Lamina propria. Leukozyten wurden aus dem Gesamtdarm von *IL-2*^{-/-}-Mäusen isoliert, über 3 h mit PMA und Ionomycin stimuliert und die Produktion intrazellulärer Zytokine der CD3⁺CD4⁺-Zellen mittels FACS bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentativer Dotplot aus drei analysierten Tieren pro Gruppe. Die Zahlen geben die Mittelwerte der Prozentzahl positiver Zellen aus den analysierten Tieren an ± Stabw. * p < 0,05 im Vergleich zu *B. vulgatus*-monokolonisierten Mäusen.

Die Produktion von IFN-γ und IL-17 in den Lamina propria T-Zellen SPF-kolonisierter *IL-2*^{-/-}-Tiere weist auf eine Th1 und zumindest partielle Th17 induzierte Kolitis hin. T-Zellen der *B. vulgatus*-monokolonisierten Tiere scheinen dagegen weder in Th1- oder Th2- noch in Th17-Richtung polarisiert zu sein.

3.4 *B. vulgatus* induziert semi-mature Lamina propria-dendritische Zellen durch IL-6

Verschiedene Studien belegten, dass IL-6 bei der Differenzierung dendritischer Zellen zu einem semi-maturen Phänotyp (CD40^{lo}CD80^{lo}MHCII^{hi}) eine wichtige Rolle spielt (Frick *et*

al. 2006; Hegde *et al.* 2004). Es konnte eine IL-6 vermittelte Reduktion der CCR7-Expression auf DCs, sowie eine reduzierte Migration dieser DCs beobachtet werden (Hegde *et al.* 2004). Zudem waren IL-6 induzierte semi-mature DCs durch eine geringere Responsivität gegenüber LPS charakterisiert (Hegde *et al.* 2004; Park *et al.* 2004).

Es ist *in vitro* beschrieben, dass *B. vulgatus* semi-mature DCs (CD40^{lo}CD80^{lo}MHCII^{hi}) induziert, die auf einen zweiten Stimulus mit *E. coli* eine deutliche Reduktion der TNF- α Sekretion und T-Zell-Aktivierung im Vergleich zu naiven *E. coli*-stimulierten DCs zeigten. Die reduzierte Responsivität der *B. vulgatus* stimulierten DCs gegenüber *E. coli* erwies sich als IL-6 abhängig (Frick *et al.* 2006).

Zunächst sollte *in vitro* geklärt werden, ob *B. vulgatus*-stimulierte DCs, vergleichbar mit den beschriebenen semi-maturen DCs in der Literatur, eine reduzierte CCR7-Expression, verbunden mit einer verminderten Migrationskapazität, sowie eine geringere Responsivität gegenüber LPS zeigen. Da funktionell eingeschränkte, semi-mature DCs in Gegenwart von IL-6 induziert wurden (Frick *et al.* 2006; Geisel *et al.* 2007; Hegde *et al.* 2004), sollte zusätzlich der Einfluss von IL-6 auf diese Funktionen bestimmt werden.

3.4.1 CCR7-Expression auf *B. vulgatus*- oder *E. coli*-stimulierten DCs

Zur Bestimmung der CCR7-Expression auf knochenmarksgereiften WT- und *IL-6*^{-/-}-DCs wurden DCs mit *B. vulgatus* oder *E. coli* stimuliert, die mRNA der Zellen isoliert und die Expression der CCR7-mRNA über quantitative real-time PCR bestimmt (Abb. 14A). Zusätzlich wurde die CCR7-Expression (Abb. 14B), sowie die Expression der Aktivierungsmarker auf den Zellen mittels FACS analysiert.

Im Vergleich zu *E. coli*-stimulierten Zellen exprimierten *B. vulgatus*-stimulierte Zellen weniger CCR7-mRNA (Abb. 14A). Übereinstimmend damit konnte auch mittels FACS eine verminderte CCR7-Expression auf *B. vulgatus*-stimulierten im Vergleich zu *E. coli*-stimulierten DCs festgestellt werden (Abb. 14B). Dagegen war auf *IL-6*^{-/-}-DCs die verminderte CCR7-Expression in *B. vulgatus*-stimulierten DCs sowohl auf mRNA-Ebene wie auch auf Proteinebene aufgehoben.

Zusätzlich wurde der von Frick *et al.* beobachtete semi-mature Phänotyp (CD40^{lo}MHCII^{hi}) *B. vulgatus*-stimulierter DCs, sowie der mature Phänotyp (CD40^{hi}MHCII^{hi}) *E. coli*-stimulierter DCs bestätigt (Daten nicht gezeigt) (Frick *et al.* 2006).

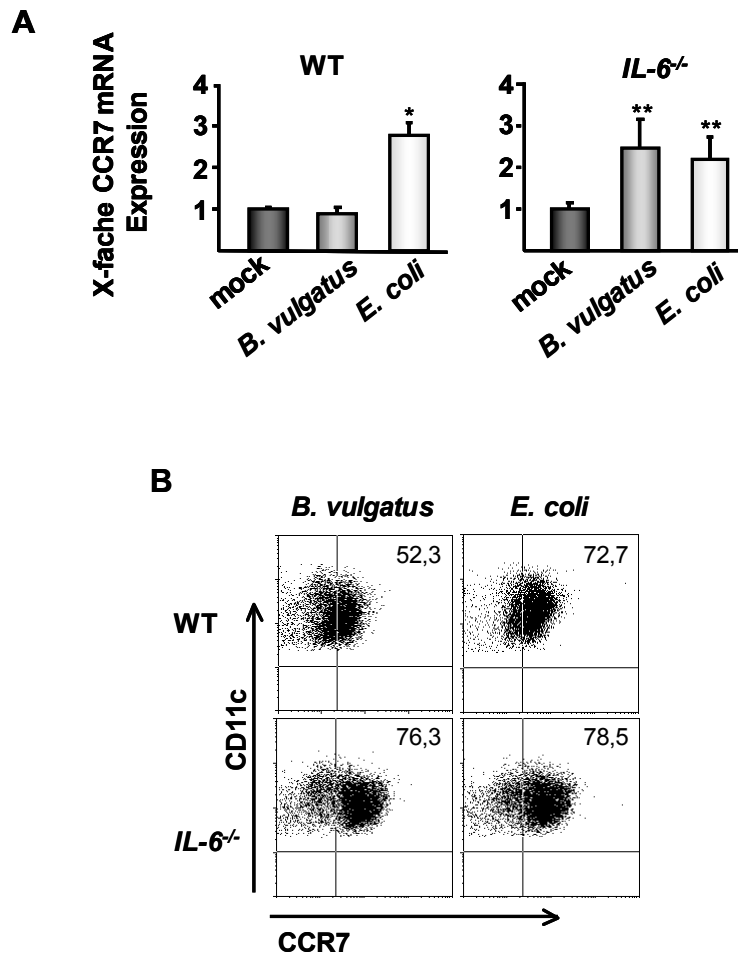


Abb. 14: CCR7-Expression auf knochenmarksgereiften DCs. WT- oder *IL-6*^{-/-}-DCs wurden entweder mit *B. vulgatus* oder mit *E. coli* stimuliert. A) Nach 4 h wurde die mRNA der DCs isoliert und die CCR7-mRNA-Expression mittels quantitativer real-time PCR bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Jedes Experiment wurde in Duplikaten durchgeführt, aus denen sich der Mittelwert ± Stabw. darstellt. mock: unstimulierte Zellen. B) Nach 20 h Stimulation wurde mittels FACS die Expression von CCR7 auf CD11c⁺-Zellen bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentativer Dotplot aus drei unabhängigen Experimenten. * p < 0,05 im Vergleich zu *B. vulgatus*- und zur mock-Kontrolle; ** p < 0,05 im Vergleich zur mock-Kontrolle.

3.4.2 Migration *B. vulgatus*- oder *E. coli*-stimulierter DCs

Um zu ermitteln, ob die *B. vulgatus*-induzierte Suppression der CCR7-Expression auf knochenmarksgereiften DCs eine Auswirkung auf die Migration dendritischer Zellen hat, wurden *B. vulgatus*- oder *E. coli*-stimulierte DCs in einem Transwell-Migrations-Assay untersucht.

Dazu wurden *B. vulgatus*- oder *E. coli*-stimulierte DCs in das obere und die CCR7-Liganden (CCL19 und CCL21) in das untere Kompartiment des Transwells gegeben. Nach 4 h wurde die Anzahl der in das untere Kompartiment gewanderten Zellen mittels FACS

bestimmt. Zusätzlich wurde die IL-6-Abhängigkeit der Migration in *IL-6*^{-/-}-DCs betrachtet. Als Negativkontrolle diente die Anzahl migrierter Zellen ohne Chemokin-Zugabe (Abb. 15).

In WT-Mäusen war in *B. vulgatus*-stimulierten DCs eine reduzierte Migration der Zellen im Vergleich zu *E. coli*-stimulierten DCs entlang des Chemokin-Gradienten zu beobachten. Dieser Effekt war in *IL-6*^{-/-}-DCs aufgehoben.

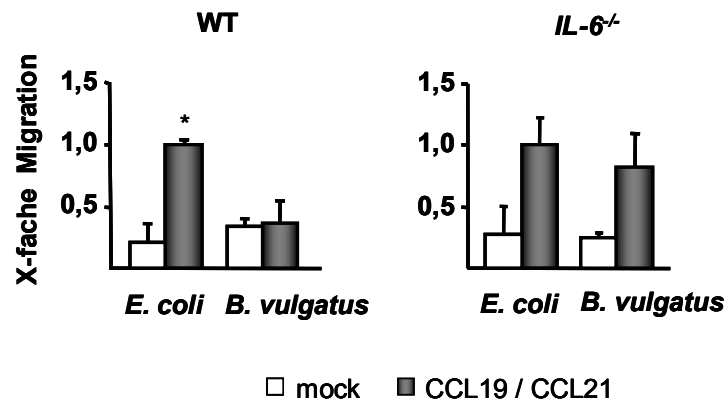


Abb. 15: Migrationspotential *B. vulgatus*- oder *E. coli*-stimulierter DCs. WT- und *IL-6*^{-/-}-DCs wurden mit *B. vulgatus* oder *E. coli* stimuliert, nach 24 h geerntet und ein Transwell-Migrations-Assay über 4 h durchgeführt. Die Anzahl der Zellen, die entlang des Chemokin-Gradienten ins untere Kompartiment migrierten, wurde mittels FACS bestimmt; Zur Darstellung wurden die *E. coli*-stimulierten DCs, die entlang des Chemokin-Gradienten ins untere Kompartiment migriert waren, auf eins normalisiert. mock: Zellen, die ohne Chemokin-Gradienten in das untere Kompartiment migrierten. Gezeigt sind repräsentative Daten aus drei unabhängigen Experimenten. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt, aus denen sich der Mittelwert ± Stabw. darstellt. * $p < 0,05$ im Vergleich zu *B. vulgatus*-stimulierten Zellen.

3.4.3 Responsivität *B. vulgatus*- oder *E. coli*-stimulierter DCs gegenüber LPS

Semi-mature DCs zeigen neben einer reduzierten CCR7-Expression und einem verminderten Migrationspotential auch eine geringere Responsivität gegenüber LPS (Hegde *et al.* 2004). Daher wurden knochenmarksgereifte, *B. vulgatus*-stimulierte DCs anhand ihrer Reaktivität gegenüber LPS untersucht. Die DCs wurden entweder mit *B. vulgatus* oder mit LPS stimuliert, oder mit *B. vulgatus* vorstimuliert und anschließend mit LPS restimuliert. Aus den Überständen der stimulierten Zellen wurde die IL-6- und TNF- α -Konzentration über ELISA bestimmt.

Die Stimulation dendritischer Zellen mit LPS führte im Vergleich zu *B. vulgatus*-stimulierten DCs zu einer deutlichen Produktion von TNF- α . Dagegen zeigten *B. vulgatus* vorstimulierte DCs, die mit LPS restimuliert wurden, eine Reduktion der TNF- α Produktion um 75 % im Vergleich zu naiven LPS-stimulierten DCs (Abb. 16). Die IL-6-Produktion zeigte sich in *B. vulgatus*-vorbehandelten, LPS-stimulierten und in naiven LPS-stimulierten

DCs nahezu unverändert. In *B. vulgatus*-vorbehandelten, LPS-stimulierten *IL-6*^{-/-}-DCs war die signifikante Reduktion der TNF- α Produktion im Vergleich zu LPS-stimulierten DCs aufgehoben. Es lässt sich somit eine IL-6-Abhängigkeit der reduzierten Responsivität *B. vulgatus*-induzierter dendritischer Zellen gegenüber einem nachfolgenden LPS-Stimulus feststellen.

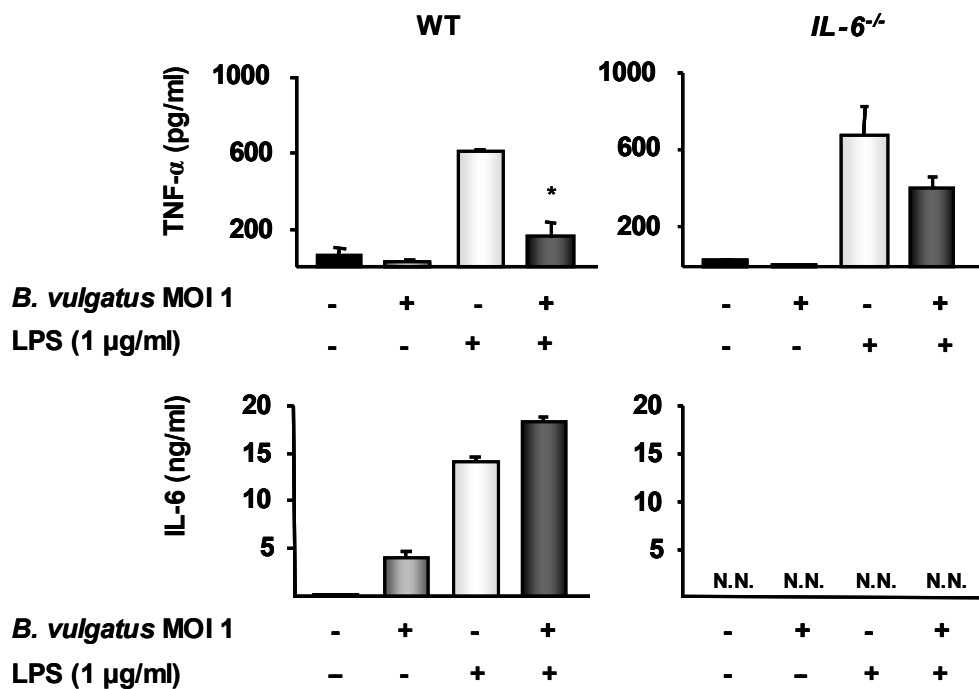


Abb. 16: Responsivität gegenüber LPS-Stimulation in WT- und *IL-6*^{-/-}-DC. DCs wurden mit *B. vulgatus*, oder LPS, oder mit *B. vulgatus* vor- und mit LPS restimuliert und aus den Überständen TNF- α und IL-6 mittels ELISA gemessen. Gezeigt sind repräsentative Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt, aus denen sich der Mittelwert \pm Stabw. darstellt. * $p < 0,05$ im Vergleich zu LPS-stimulierten DCs. N.N.: nicht nachweisbar.

Die *in vitro* Versuche bestätigten, dass *B. vulgatus* semi-mature DCs (CD40^{lo}CD80^{lo}MHCII^{hi}) induziert, die im Vergleich zu *E. coli*-stimulierten DCs eine reduzierte CCR7-Expression und ein vermindertes Migrationspotential aufweisen. Außerdem zeigten semi-mature DCs eine geringere Responsivität gegenüber LPS im Vergleich zu nativen DCs. In *IL-6*^{-/-}-DCs waren alle untersuchten funktionellen Einschränkungen *B. vulgatus*-stimulierter DCs aufgehoben. IL-6 scheint daher für die Funktionseinschränkungen semi-maturer DCs eine wichtige Rolle zu spielen.

3.5 IL-6-Expression dendritischer Zellen in der Lamina propria *B. vulgatus*-kolonisierter *IL-2^{-/-}*-Mäuse

In vitro Vorarbeiten zeigten, dass *B. vulgatus*-stimulierte DCs IL-6 produzierten, andere proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder IL-12 jedoch nicht induziert wurden (Frick *et al.* 2006). *E. coli*-stimulierte DCs produzierten dagegen TNF- α , IL-12 und IL-6. Die Stimulation dendritischer Zellen mit *B. vulgatus* führte zu semi-maturen (CD40^{lo}MHC-II^{hi}) DCs, während *E. coli* mature (CD40^{hi}MHC-II^{hi}) DCs induzierte. Frick *et al.* demonstrierten in weiteren Versuchen, dass IL-6 in Abwesenheit der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-12 eher eine immunregulatorische als immunaktivierende Funktion ausübt (Frick *et al.* 2006). In dieser Arbeit zeigten *B. vulgatus*-stimulierte DCs IL-6-abhängige funktionelle Einschränkungen bezüglich der CCR7-Expression, des Migrationspotentials und der LPS-Responsivität.

Es sollte nun *in vivo* untersucht werden, ob, vergleichbar mit den *in vitro* Vorarbeiten, Lamina propria-dendritische Zellen (LP-DCs) *B. vulgatus*-monokolonisierter Mäuse IL-6 in Abwesenheit von TNF- α produzieren. Dazu wurde die Expression von IL-6 und TNF- α in LP-DCs *B. vulgatus*- und *E. coli*-monokolonisierter *IL-2^{-/-}*-Mäuse mittels intrazellulärer Zytokinfärbung, bzw. mittels quantitative real-time PCR analysiert.

Um die Anzahl CD11c⁺-Zellen für diese Untersuchungen zu expandieren, wurden *B. vulgatus*- und *E. coli*-monokolonisierte Tiere mit einer Tumorzelllinie (B16-FL Zellen) behandelt, die konstitutiv stabilen Flt3-Liganden produziert (Mach *et al.* 2000). Flt3-Liganden wirken in einer frühen Entwicklungsphase auf hämatopoetische Vorläuferzellen und unterstützen vor allem die Proliferation dendritischer Zellen durch die Bindung an Flt3-Rezeptoren (Mach *et al.* 2000; Shortman & Naik 2007). Eventuell auftretende Veränderungen des DC-Phänotyps und der Verteilung der DC-Subpopulationen wurde in Kontrollexperimenten untersucht.

Expansion dendritischer Zellen mittels Flt3-Ligand

B. vulgatus- und *E. coli*-monokolonisierten *IL-2^{-/-}*-Mäusen wurden subkutan 3 x 10⁶ B16-FL Zellen injiziert. Nach zwei Wochen wurden die Mäuse getötet, die Expression der Aktivierungsmarker auf LP-DCs untersucht und die Verteilung der DC-Subpopulationen bestimmt. Aus dem Gesamtdarm wurden Leukozyten isoliert und mittels FACS die Expression von CD11c, CD40, MHC-Klasse-II, CD11b und B220 analysiert. Bei der Auswertung wurden T-, NK- und B-Zellen durch mAK gegen CD3 ϵ , DX5 und CD19 ausgeschlossen und nur CD11c⁺-Zellen berücksichtigt.

Der prozentuale Anteil LP-DCs an der Leukozytenpopulation erhöhte sich durch die Behandlung mit Flt3-L von ~1-3 % auf ~7-15 %. Die Expression der Aktivierungsmarker zeigte in CD11c⁺-Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten und Flt3-L-expandierten LP-DCs (Abb. 17).

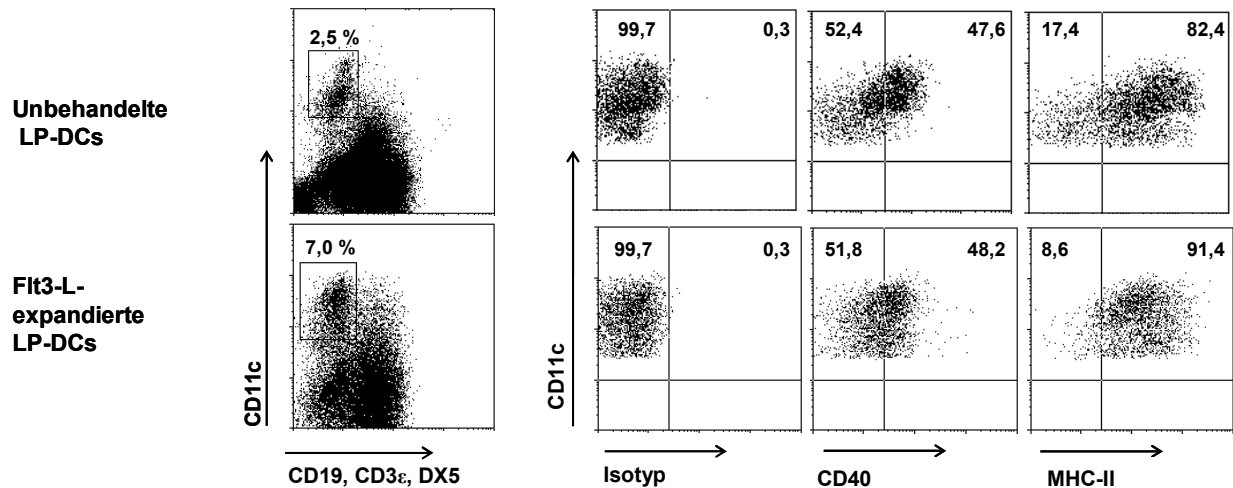


Abb. 17: CD11c⁺-Population und Expression von Aktivierungsmarkern in Flt3-L-expandierten und unbehandelten LP-DCs aus *E. coli*-kolonisierten *IL-2^{-/-}*-Mäusen. *E. coli*-monokolonisierten *IL-2^{-/-}*-Mäusen wurden subkutan B16-FL Zellen injiziert, nach zwei Wochen getötet, die Leukozyten isoliert und diese LP-DCs anhand der Aktivierungsmarker mit LP-DCs aus unbehandelten *E. coli*-kolonisierten *IL-2^{-/-}*-Mäusen verglichen. Gezeigt ist ein repräsentativer Dotplot aus drei analysierten Tieren pro Gruppe.

Hinsichtlich der DC-Subpopulationen führte die Behandlung der Mäuse mit Flt3-L zu einem Anstieg der plasmazytoiden DCs im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Der prozentuale Anteil pDCs zur CD11c⁺-Population stieg in den Flt3-L behandelten Mäusen um ~15 %. Bei der Analyse der Aktivierungs- und Maturationsmarkern konnte weder in den myeloiden noch in den plasmazytoiden DC-Subpopulationen signifikante Unterschiede zwischen Flt3-L-expandierten und unbehandelten LP-DCs gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Nachdem gezeigt wurde, dass durch die Behandlung der Mäuse mit Flt3-L keine signifikanten Änderungen der LP-DCs hinsichtlich der Aktivierungsmarker auftreten wurde untersucht, ob LP-DCs *B. vulgatus*-monokolonisierter Tiere IL-6 in Abwesenheit von TNF- α produzieren. Dazu wurden *B. vulgatus*- oder *E. coli*-monokolonisierte *IL-2^{-/-}*-Mäuse mit Flt3-L behandelt, die Leukozyten isoliert und die Expression von IL-6 und TNF- α der CD11c⁺-Zellen mittels intrazellulärer Färbung analysiert.

LP-DCs *B. vulgatus*-monokolonisierter Mäuse produzierten ca. 4-mal mehr IL-6 im Vergleich zu LP-DCs *E. coli*-kolonisierter Tiere. Im Gegensatz dazu war die TNF- α -

Produktion in LP-DCs *B. vulgatus*-kolonisierter Tiere ca. 3-mal geringer als in LP-DCs *E. coli*-kolonisierter Tiere (Abb. 18B).

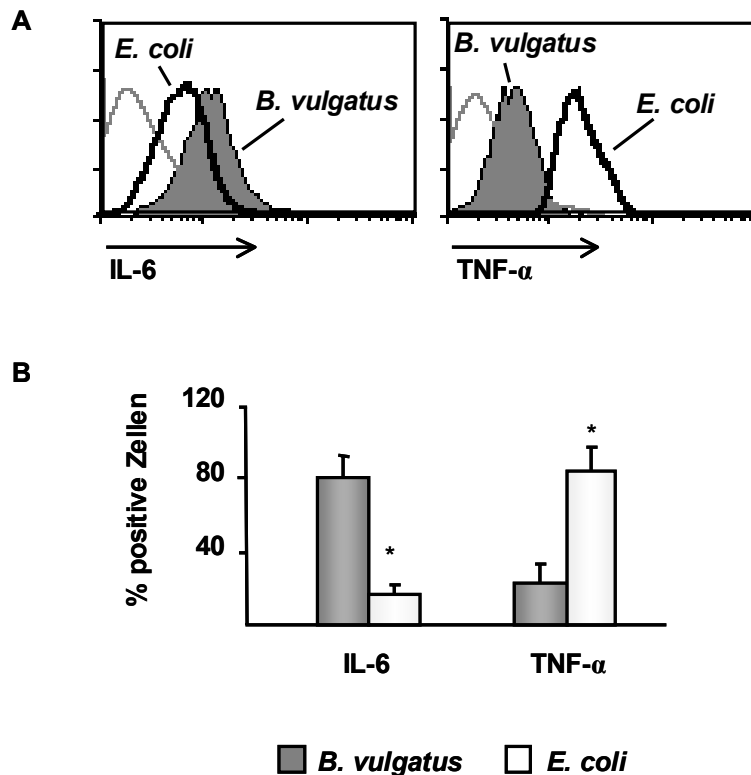


Abb. 18: IL-6- und TNF- α -Produktion dendritischer Zellen in der Lamina propria. *B. vulgatus*- oder *E. coli*-monokolonisierten *IL-2*^{-/-}-Mäusen wurden subkutan B16-FL Zellen injiziert, nach 2 Wochen getötet und die Leukozyten aus dem Gesamtdarm isoliert. Durch intrazelluläre Zytokinfärbung wurde die Expression von IL-6 (PE) und TNF- α (PE) in den LP-DCs analysiert. A) Histogramme der intrazellulären IL-6 und TNF- α Produktion in *B. vulgatus*- (grau) und *E. coli*- (weiß) kolonisierten Mäusen. Hellgrau: Isotyp (PE). Gezeigt ist ein repräsentatives Histogramm aus mindestens drei analysierten Tieren pro Gruppe. B) Auswertung der Dotplots der intrazellulären IL-6 und TNF- α Produktion DCs in *B. vulgatus*- (grau) und *E. coli*- (weiß) kolonisierten Mäusen. Gezeigt sind Mittelwerte der prozentualen Anteile IL-6 beziehungsweise TNF- α positiver Zellen aus drei analysierten Tieren pro Gruppe \pm Stabw. $p < 0,05$ im Vergleich zu *B. vulgatus*-monokolonisierten Tieren.

Zusätzlich wurden Flt3-L-expandede LP-DCs *B. vulgatus*- oder *E. coli*-monokolonisierter Mäuse mittels eines FACS-Sortiergerätes isoliert und über quantitative real-time PCR die Expression von IL-6 und TNF- α mRNA bestimmt.

LP-DCs *B. vulgatus*-monokolonisierter Mäuse zeigten eine höhere IL-6 mRNA und eine geringere TNF- α mRNA Expression im Vergleich zu *E. coli*-monokolonisierten Tieren. Das Verhältnis von IL-6 zu TNF- α mRNA war bei LP-DCs *B. vulgatus*-monokolonisierter Tiere signifikant erhöht (Abb. 19).

LP-DCs *B. vulgatus*-monokolonisierter *IL-2*^{-/-}-Mäuse produzierten somit hauptsächlich IL-6 und nur geringfügig TNF- α im Vergleich zu LP-DCs *E. coli*-monokolonisierter Tiere.

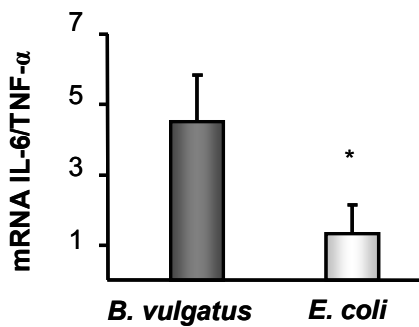


Abb. 19: Verhältnis von IL-6 zu TNF- α mRNA dendritischer Zellen in der Lamina propria. *B. vulgatus*- oder *E. coli*-monokolonisierten *IL-2*^{-/-}-Mäusen wurden subkutan B16-FL Zellen injiziert und nach zwei Wochen getötet. Nach der Leukozytenisolation aus dem Gesamtdarm wurden CD11c⁺-Zellen mit einem FACS-Sortiergerät isoliert und die IL-6 und TNF- α mRNA quantifiziert. Dargestellt ist das mRNA-Verhältnis von IL-6/TNF- α . Gezeigt sind Mittelwerte aus drei analysierten Tieren pro Gruppe \pm Stabw. * $p < 0,05$ im Vergleich zu *B. vulgatus*-monokolonisierten Tieren.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass LP-DCs *B. vulgatus*-monokolonisierter und *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierter *IL-2*^{-/-}-Mäuse vermutlich in Abhängigkeit von IL-6 zu semi-maturen DCs differenzieren. Semi-mature LP-DCs zeigten im Vergleich zu maturierten LP-DCs *E. coli*- und SPF-kolonisierter Tiere eine reduzierte CCR7-Expression, sowie eine reduzierte T-Zell-Aktivierung. Dies könnte die Kolitisprävention in *B. vulgatus*-monokolonisierten und *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierten *IL-2*^{-/-}-Mäusen erklären.

4 Diskussion

Die Etiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) ist noch nicht vollständig erforscht. Neben einer genetischen Prädisposition werden Umweltfaktoren und eine systemische Dysregulation des Immunsystems als Hauptursache der CED diskutiert (Baumgart & Carding 2007; Sartor 2006; Strober *et al.* 2007; Xavier & Podolsky 2007). Untersuchungen in Mausmodellen zeigen, dass die Darmflora entscheidend zur Kolitisinduktion beiträgt. In dieser Arbeit sollte die unterschiedliche Modulation dendritischer Zellen durch Kommensale untersucht werden.

Als Kolitismodell diente die IL-2-defiziente Maus. Diese Mäuse entwickeln unter SPF Bedingungen eine ausgeprägte Kolitis, während Tiere unter keimfreien Bedingungen gesund bleiben. Zudem konnte gezeigt werden, dass verschiedene Bakterienstämme unterschiedliches kolitogenes Potential besitzen. *IL-2*^{-/-}-Mäuse, die nur mit *E. coli* mpk besiedelt wurden, entwickelten eine Kolitis, dagegen blieben *IL-2*^{-/-}-Mäuse, die nur mit *Bacteroides vulgatus* besiedelt wurden, gesund. Bei kokolonisierten Tieren konnte *B. vulgatus* die durch *E. coli* mpk induzierte Kolitis verhindern. Dies konnte durch histologische Untersuchungen gezeigt werden (Waidmann *et al.* 2003).

Die Kolitisinduktion in *IL-2*^{-/-}-Mäusen wird durch Dysregulation der T-Zell-Reifung (Malek *et al.* 2002; Wolf *et al.* 2001) mit nachfolgender überschießender Th1-Antwort verursacht (Ehrhardt *et al.* 1997; Strober *et al.* 2002). Da die Aktivierung und Polarisierung von T-Zellen hauptsächlich durch mature DCs induziert wird (Banchereau *et al.* 2000; Banchereau & Steinman 1998), wurde in dieser Arbeit untersucht, ob *B. vulgatus* oder *E. coli* Lamina propria-dendritische Zellen (LP-DCs) der gnotobiotischen Tiere unterschiedlich aktivieren. Die Modulation dendritischer Zellen wurde vor Auftreten klinischer und histologischer Zeichen der Inflammation in *E. coli*-kolonisierten Tieren untersucht. Dadurch konnte der immunologische Status vor Beginn der Kolitis im Vergleich zu gesundbleibenden *B. vulgatus*-kolonisierten Tieren analysiert werden. Außerdem konnte die Aktivierung dendritischer Zellen durch körpereigene proinflammatorische Zytokine, die während des Entzündungsprozesses von Immunzellen sezerniert werden, ausgeschlossen werden. Als Referenztiere zu den gnotobiotischen Tieren dienten SPF-kolonisierte und keimfreie Tiere. SPF-kolonisierte Tiere erkrankten im Vergleich zu *E. coli*-kolonisierten Tieren früher an einer Kolitis (Waidmann *et al.* 2003) und zeigten zum Zeitpunkt der Untersuchungen bereits Darmentzündungen. Keimfreie Tiere dagegen blieben wie *B. vulgatus*-monokolonisierte und *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierter *IL-2*^{-/-}-Mäuse gesund (Waidmann *et al.* 2003).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LP-DCs *B. vulgatus*-monokolonisierter und *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierter *IL-2^{-/-}*-Mäuse einen semi-maturen Phänotyp (CD40^{lo}CD80^{lo}CD86^{lo}MHCII^{hi}) aufweisen. Im Gegensatz dazu wurden in *E. coli*- und SPF-kolonisierten Tieren aktivierte und matura (CD40^{hi}CD80^{hi}CD86^{hi}MHCII^{hi}) LP-DCs bestimmt. Weitere Untersuchungen zeigten in *E. coli*- und SPF-kolonisierten Tieren eine reduzierte Anzahl LP-DCs, sowie eine erhöhte Anzahl CCR7⁺-DCs in den mesenterialen Lymphknoten im Vergleich zu *B. vulgatus*-kolonisierten Tieren.

Hinsichtlich der Aktivierung von T-Zellen in der Lamina propria konnte in SPF-kolonisierten Tieren eine Polarisierung der T-Zellen in Richtung Th1 festgestellt werden, während T-Zellen in der Lamina propria *B. vulgatus*-monokolonisierter Tiere keine Th-Antwort zeigten. Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass mature LP-DCs *E. coli*- und SPF-kolonisierter Tiere in die mesenterialen Lymphknoten migrieren und dort naive T-Zellen in Richtung Th1 polarisieren. Dagegen bleiben semi-mature DCs *B. vulgatus*-kolonisierter Tiere in der Lamina propria, wodurch naive T-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten weder aktiviert noch polarisiert werden können (Abb.: 20). Die Kolitisprävention in *B. vulgatus*-kolonisierten Tieren war außerdem mit einer erhöhten IL-6- und verminderten TNF- α -Produktion Lamina propria-dendritischer Zellen verbunden. Es ist daher denkbar, dass *B. vulgatus*-induziertes IL-6 für die immunregulatorische Funktion von *B. vulgatus* verantwortlich sein könnte.

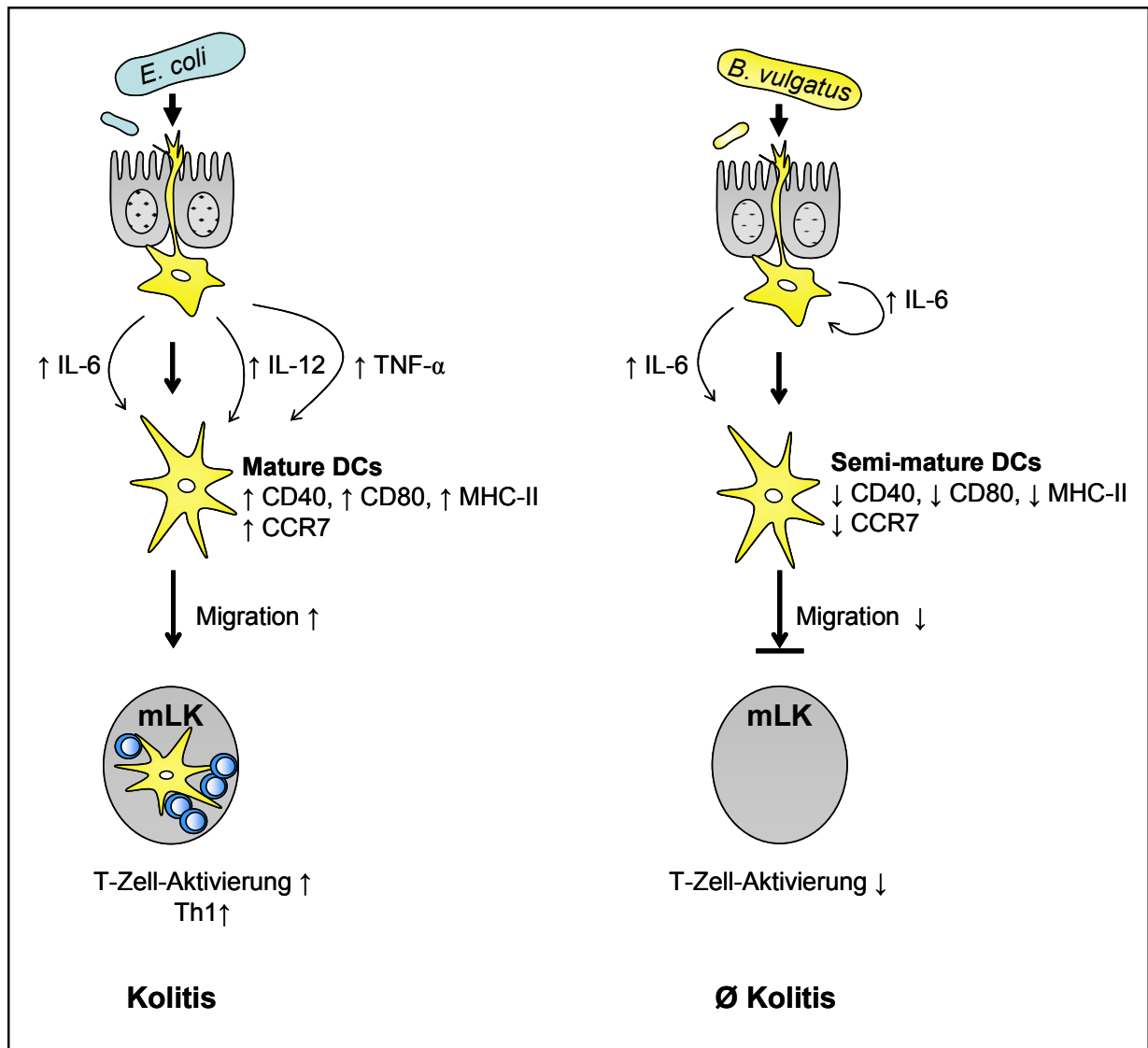


Abb. 20: Hypothese zur Kolitisprävention in *B. vulgatus*-kolonisierten Tieren. *B. vulgatus* induziert, vermutlich über einen IL-6 abhängigen Mechanismus, semi-mature LP-DCs, die gegenüber muren DCs eine reduzierte CCR7-Expression und ein vermindertes Migrationspotential in die mesenterialen Lymphknoten aufweisen. Durch die reduzierte Migration der semi-maturen LP-DCs kann keine Aktivierung der T-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten stattfinden. Dies könnte die Kolitisprävention in *B. vulgatus*-kolonisierten Tieren erklären. mLK: mesenteriale Lymphknoten.

4.1 Induktion semi-maturer DCs in der Lamina propria *B. vulgatus* - monokolonisierter *IL-2^{-/-}*-Mäuse

Eine wichtige Funktion immaturer DCs ist die Antigenaufnahme und deren Präsentation an naive T-Zellen. Nach Antigenaufnahme durchlaufen DCs einen Reifungsprozess, in dessen Folge ihre endozytischen Aktivitäten abnehmen und verstärkt MHC-Klasse-II (MHC-II) und kostimulatorische Moleküle (CD40, CD80 und CD86), die zur Präsentation und Aktivierung

der naiven T-Zellen nötig sind, exprimiert werden. Die Expression dieser Oberflächenmoleküle zeigt daher den Aktivierungs- und Maturationszustand dendritischer Zellen an.

In dieser Arbeit wurde die Expression von CD40, CD80, CD86 und MHC-II auf LP-DCs in *E. coli*-, *B. vulgatus*-monokolonisierten, *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierten und SPF-kolonisierten, sowie in keimfreien Mäusen untersucht. LP-DCs *E. coli*- und SPF-kolonisierter *IL-2^{-/-}*-Mäuse zeigten eine signifikante Erhöhung des Aktivierungsmarkers CD40 und eine deutliche Erhöhung der Aktivierungsmarker CD80 und CD86 im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen.

Der LP-DC Phänotyp *E. coli*-monokolonisierter und SPF-kolonisierter Mäuse entspricht vollständig aktivierten und maturierten DCs (CD40^{hi}CD80^{hi}CD86^{hi}MHCII^{hi}) (Banchereau *et al.* 2000), *B. vulgatus*-assoziierte Tiere zeigen dagegen eine unvollständige (CD40^{lo}CD80^{lo}CD86^{lo}MHCII^{hi}) Aktivierung und Maturation Lamina propria-dendritischer Zellen.

Die Aktivierungszustände muriner Lamina propria-dendritischer Zellen werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Während einige Studien unter SPF-Bedingungen hauptsächlich immature DCs zeigten (Inaba *et al.* 1993; Mowat 2003), konnten kürzlich durchgeführte Studien eine hohe Expression von MHC-II, und eine schwache Expression von CD40, CD80 und CD86 (Krajina *et al.* 2003), bzw. eine erhöhte Expression von CD86 (Takenaka *et al.* 2007) beobachten. Übereinstimmend mit dieser Arbeit konnten dagegen Cruickshank *et al.* in SPF-*IL-2^{-/-}*-Mäusen, die bereits an einer Kolitis litten, einen aktivierten LP-DC Phänotyp beobachten (Cruickshank *et al.* 2005). Hinsichtlich der Aktivierungszustände Lamina propria-dendritischer Zellen monokolonisierter Tiere liegen bislang noch keine Ergebnisse vor. *In vitro* wurden knochenmarksgereifte DCs mit *E. coli* stimuliert. Diese *E. coli* stimulierten DCs zeigten einen aktivierten und maturierten DC-Phänotyp (Frick *et al.* 2006).

Der LP-DC-Phänotyp *B. vulgatus*-kolonisierter Tiere (CD40^{lo}CD80^{lo}CD86^{lo}MHCII^{hi}) wurde bereits *in vitro* beschrieben und als semi-matur bezeichnet (Frick *et al.* 2006; Geisel *et al.* 2007; Hegde *et al.* 2004). Semi-mature DCs sind durch eine geringe Expression von CCR7 und damit durch ein geringes Migrationspotential charakterisiert. Außerdem zeigen sie gegenüber LPS eine reduzierte T-Zell-Aktivierung (Hegde *et al.* 2004). Auch *in vitro* führte die Stimulation dendritischer Zellen mit *B. vulgatus* zu einem semi-maturen Zustand. Wurden diese *B. vulgatus*-stimulierten DCs mit *E. coli* restimuliert, konnte *E. coli* keine vollständige Aktivierung der DCs im Hinblick auf Aktivierungs- und Maturationsmarker, sowie der T-

Zell-Aktivierung im Vergleich zu naiven *E. coli*-stimulierten DCs induzieren (Frick *et al.* 2006).

Keimfreie Tiere zeigten trotz Abwesenheit von Bakterien eine erhöhte MHC-II-Expression der LP-DCs. Die Expression der MHC-II-Moleküle wird wahrscheinlich durch Nahrungsmittelantigene und mikrobielle Bestandteile wie z.B. LPS, im autoklavierten Streu induziert. Auch andere Arbeitsgruppen beobachteten in keimfreien Mäusen eine leichte Aktivierung des Mukosa-assoziierten Immunsystems (Krajina *et al.* 2003; Takenaka *et al.* 2007).

4.1.1 Expression von Aktivierungsmarkern auf Lamina propria-dendritischen Zellen in WT-Mäusen

Vergleichbar mit *IL-2*^{-/-}-Mäusen zeigten *E. coli*- und SPF-kolonisierte Tiere eine erhöhte Expression der Aktivierungsmarker im Vergleich zu *B. vulgatus*-monokolonisierten, *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien Tieren. Die Aktivierung und Stimulation der LP-DCs scheint daher durch die IL-2-Defizienz nicht beeinträchtigt zu sein. Die Induktion der Kolitis in *IL-2*^{-/-}-Mäusen beruht vielmehr auf einem Mangel an regulatorischen T-Zellen (Fontenot *et al.* 2005; Malek *et al.* 2002; Setoguchi *et al.* 2005; Wolf *et al.* 2001). Dieser Mangel wird für die überschießende Antwort aktivierter T-Effektorzellen verantwortlich gemacht.

4.1.2 DC-Subpopulationen in der Lamina propria

In der Maus konnten bisher vier DC-Subpopulationen in der Lamina propria identifiziert werden (Tab. 9): (i) CD11c⁺CD11b⁺CD8 α ⁻CD4⁻ (= myeloide DC, mDC), (ii) CD11c⁺CD11b⁻CD8 α ⁻CD4⁻, (iii) CD11c⁺CD11b⁻CD8 α ⁺CD4⁻ und CD11c^{int}B220⁺CD11b⁻CD8 α ^{-/+} (= plasmazytoide DC; pDC) (Iwasaki 2007; Johansson & Kelsall 2005; Kelsall & Leon 2005). Die einzelnen Subpopulationen unterscheiden sich durch ihre Entwicklung und ihre Funktionen (Tab. 9) (Ardavin 2003; Banchereau *et al.* 2000; Shortman & Naik 2007; Shortman & Liu 2002).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die unterschiedliche Kolonisierung der Mäuse einen Einfluss auf die Verteilung der DC-Subpopulationen hat. Anhand der Expression von CD11c, CD11b, B220 und CD8 wurden die DC-Subpopulationen bestimmt. In allen Mausgruppen wurden hauptsächlich mDCs und nur wenige pDCs gefunden. *E. coli*-monokolonisierte

Mäuse zeigten bereits vor Beginn der intestinalen Inflammation einen leichten Anstieg der pDCs, der in erkrankten SPF-kolonisierten Mäusen noch deutlicher zu sehen war. Dagegen konnte keine Änderung in der prozentualen Verteilung der pDCs und mDCs in den anderen Versuchsgruppen beobachtet werden. CD11c⁺CD8⁺-Zellen waren nur in sehr geringer Anzahl vorhanden.

In der Literatur wird die Verteilung der Subpopulationen an der DC-Gesamtpopulation in der Lamina propria kontrovers diskutiert. In den meisten Studien dominieren mDCs gegenüber pDCs (Johansson & Kelsall 2005; Karlis *et al.* 2004; Mowat 2003; Niess *et al.* 2005). Es wird vermutet, dass mDCs Bakterien im terminalen Ileum aufnehmen und sich in entzündeten Arealen vermehrt ansammeln (Karlis *et al.* 2004; Mowat 2003; Niess *et al.* 2005). Die Verschiebung der DC-Subpopulationen in Richtung pDCs in *E. coli*-monokolonisierten und SPF-kolonisierten Mäusen wurde auch in anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Krajina *et al.* 2003). Karlis *et al.* konnten Ansammlungen der pDCs in inflammatorisch veränderten Arealen zeigen (Karlis *et al.* 2004). Mature pDCs besitzen die Fähigkeit naive T-Zellen zu IL-10-produzierenden T_{reg} zu differenzieren (Ito *et al.* 2007; Kawamura *et al.* 2006; Moseman *et al.* 2004). Der erhöhte Anteil pDCs in den kolitogenen Tieren könnte daher ein Mechanismus zur Regulation überschießender T-Effektorzellen darstellen, der durch den Mangel an regulatorischen T-Zellen in *IL-2*^{-/-}-Mäusen (Malek *et al.* 2002; Setoguchi *et al.* 2005) nicht wirken kann. Übereinstimmend mit dieser Arbeit werden CD11c⁺CD8⁺-Zellen in der Lamina propria nur in geringen Anteilen beobachtet (Kelsall & Leon 2005). Die Funktion der CD11c⁺CD8⁺-Subpopulation in der Lamina propria ist noch immer nicht vollständig geklärt (Tab. 9).

Tab. 9: Murine DC-Subpopulationen in der Lamina propria und deren Funktionen (verändert nach Johansson & Kelsall 2005).

DC-Subpopulation	Funktionen
CD11c ⁺ CD11b ⁺ CD8 ⁻ CD4 ⁻	Ansammlung in entzündeten Arealen (Karlis <i>et al.</i> 2004). Bakterienaufnahme im terminalen Ileum (Niess <i>et al.</i> 2005)
CD11c ⁺ CD11b ⁻ CD8 ⁻ CD4 ⁻	IL-23-Produktion im nicht-entzündlichen Zustand Bakterienaufnahme im terminalen Ileum (Becker <i>et al.</i> 2003).
CD11c ⁺ CD11b ⁻ CD8 ⁺ CD4 ⁻	Unbekannt
CD11c ⁺ CD11b ⁻ B220 ⁺	Ansammlung in entzündeten Arealen (Karlis <i>et al.</i> 2004).

4.1.3 Charakterisierung der T-Zellen in der Lamina propria

Die Aktivierung und Polarisierung naiver CD4⁺-T-Zellen in Th1-, Th2- oder Th17-Antwort findet im Lymphknoten durch antigenpräsentierende DCs statt (de Jong *et al.* 2002). Die Aktivierung von T-Zellen induziert Effektor-T-Zellen, die bei Polarisierung in Th1-Richtung hauptsächlich IFN- γ produzieren, während Th2-Zellen die Zytokine IL-4 und IL-10 sezernieren (Abbas *et al.* 1996; Ho & Glimcher 2002). Eine Th-17-Antwort ist durch IL-17 und IL-23 gekennzeichnet (Aggarwal *et al.* 2003; Weaver *et al.* 2006). Die Differenzierung der Th-Antworten ist im Organismus durch z.B. T_{reg}-Zellen streng reguliert, so dass ein Gleichgewicht zwischen den Th-Antworten besteht. Fehler in der Regulation führen zur Entgleisung des Systems und unter anderem zu inflammatorischen oder allergischen Reaktionen (Murphy *et al.* 2000; Neurath *et al.* 2002). In den meisten murinen Kollitismodellen ist das Gleichgewicht in Richtung Th1-Antwort verschoben (Strober *et al.* 2002).

Semi-mature DCs sind *in vitro* durch ein reduziertes T-Zell-Aktivierungspotential beschrieben (Frick *et al.* 2006; Hegde *et al.* 2004). Es wurde daher untersucht, ob semi-mature LP-DCs *B. vulgatus*-monokolonisierter *IL-2*^{-/-}-Mäuse eine geringere T-Zell-Aktivierung und Polarisierung im Vergleich zu SPF-kolonisierten Tieren in der Lamina propria zeigen. Es wurden Lamina propria-T-Zellen (LP-T-Zellen) aus *B. vulgatus*-monokolonisierten und SPF-kolonisierten Mäusen isoliert und durch intrazelluläre Färbung die Produktion der Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4 und IL-10 untersucht.

Es konnten signifikant mehr T-Zellen in SPF-kolonisierten Tieren im Vergleich zu *B. vulgatus*-kolonisierten Tieren isoliert werden. T-Zellen aus SPF-kolonisierten Mäusen produzierten hauptsächlich IFN- γ , TNF- α und geringe Mengen an IL-17. In LP-T-Zellen *B. vulgatus*-monokolonisierter Mäuse konnten dagegen keine der untersuchten Zytokine nachgewiesen werden.

Die Zytokinproduktion der LP-T-Zellen in SPF-kolonisierten Mäusen zeigt eine Polarisierung der T-Zellen in Richtung Th1. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Resultaten anderer Studien (Ehrhardt *et al.* 1997; Sadlack *et al.* 1995; Simpson *et al.* 1995). Neben dieser Th1-Antwort kann eine zusätzliche Th17-Antwort, durch die geringe Produktion von IL-17, nicht ausgeschlossen werden. T-Zellen differenzieren in Mäusen unter Einfluss von TGF- β und IL-6 zu Th17-Zellen (Bettelli *et al.* 2006; Veldhoen *et al.* 2006). In SPF-kolonisierten *IL-2*^{-/-}-Mäusen korreliert die Induktion der Kolitis mit geringen Mengen an TGF- β mRNA und hohen Mengen an IL-6 mRNA (Autenrieth *et al.* 1997). Die TGF- β und IL-6 mRNA

Expression könnte eine mögliche Erklärung für die Induktion einer zusätzlichen Th17-Antwort sein.

LP-T-Zellen aus *B. vulgatus*-monokolonisierten Mäusen zeigen weder eine Zytokinproduktion in Richtung Th1, Th2 noch in Richtung Th17. Es findet somit keine Polarisierung der T-Zellen statt. Auch die reduzierte Anzahl LP-T-Zellen weist auf eine verminderte Aktivierung der T-Zellen hin. Dies steht im Einklang mit *in vitro* Studien, in denen *B. vulgatus*-stimulierte DCs ein reduziertes T-Zell-Aktivierungspotential im Vergleich zu *E. coli*-stimulierten DCs zeigten (Frick *et al.* 2006). Eine weitere Erklärung für die nicht stattgefundenen Polarisierung der LP-T-Zellen in *B. vulgatus*-monokolonisierten Mäusen könnte eine verminderte Migration semi-maturer DCs in die mesenterialen Lymphknoten sein.

4.2 Induktion semi-maturer dendritischer Zellen durch IL-6

Nachdem LP-DCs *B. vulgatus*-monokolonisierter *IL-2^{-/-}*-Mäuse einen semi-maturen Phänotyp (CD40^{lo}CD80^{lo}CD86^{lo}MHCII^{hi}) aufwiesen, wurde die Induktion dieses Phänotyps genauer untersucht. Vorarbeiten zeigten, dass die Stimulation dendritischer Zellen mit *B. vulgatus* zu einer Produktion von IL-6 führte, die Sekretion anderer Zytokine (TNF- α , IL-12, IL-10) jedoch kaum induziert wurde (Frick *et al.* 2006). Die DCs wiesen eine erhöhte Expression von MHC-II und nur eine geringe Expression von CD40 auf. Zudem zeigten *B. vulgatus*-induzierte semi-mature DCs ein geringes T-Zell-Aktivierungspotential (Frick *et al.* 2006). Auf einen zweiten Stimulus mit *E. coli* zeigten *B. vulgatus*-behandelte DCs eine deutliche Reduktion der TNF- α Sekretion und T-Zell-Aktivierung im Vergleich zu naiven *E. coli*-stimulierten DCs. Lediglich die Produktion von IL-6 blieb unverändert hoch (Frick *et al.* 2006). Die geringere Responsivität der *B. vulgatus*/*E. coli*-stimulierten DCs konnte durch die Zugabe von anti-IL-6 mAk aufgehoben werden und dementsprechend durch die Vorstimulation mit rekombinantem IL-6 induziert werden. Auch die Vorstimulation mit Überständen *B. vulgatus*-stimulierter DCs führte zu einer geringeren Responsivität (Frick *et al.* 2006). Aus diesen Ergebnissen wurde vermutet, dass *B. vulgatus*-induziertes IL-6 in Abwesenheit von TNF- α und IL-12 DCs in einen semi-maturen Zustand differenziert.

Ausgehend von diesen Vorarbeiten wurde die IL-6- und TNF- α -Produktion Lamina propria-dendritischer Zellen *B. vulgatus*- und *E. coli*-monokolonisierter Tiere mittels intrazellulärer Zytokinfärbung, sowie durch mRNA-Bestimmung isolierter CD11c⁺-Zellen untersucht. Für diese Versuche wurden *IL-2^{-/-}*-Mäuse zur Expansion der DCs mit Flt3-L (FMS-like tyrosine kinase-3 ligand, Flt3-L) behandelt. Es konnte sowohl durch intrazelluläre

Zytokinfärbung, als auch durch mRNA-Bestimmung gezeigt werden, dass LP-DCs *B. vulgatus*-monokolonisierter Mäuse mehr IL-6, aber deutlich weniger TNF- α als LP-DCs *E. coli*-monokolonisierter Mäuse produzierten.

Dies steht im Einklang mit Beobachtungen anderer Studien, die IL-6 und TNF- α mRNA im Kolongewebe von *IL-2*^{-/-}-Mäusen bestimmten. Waidmann *et al.* beobachteten in *E. coli*-monokolonisierten Mäusen erhöhte Mengen an TNF- α , IFN- γ und CD14 mRNA im Vergleich zu *B. vulgatus*-monokolonisierten Mäusen (Waidmann *et al.* 2003). Eine erhöhte IL-6 mRNA Expression konnten Frick *et al.* in *B. vulgatus*-monokolonisierten Mäusen verglichen mit *E. coli*-monokolonisierten Mäusen zeigen (Frick *et al.* 2006).

Die *in vivo* Ergebnisse weisen darauf hin, dass *B. vulgatus* in LP-DCs die Produktion von IL-6, jedoch nicht von TNF- α und IL-12, induziert. Daher könnte IL-6 bei der Differenzierung von naiven LP-DCs zu semi-maturen LP-DCs eine wichtige Rolle zukommen. Durch LP-DCs produziertes IL-6 könnte zusätzlich, über einen parakrinen Loop, weitere benachbarte LP-DCs zu semi-maturen DCs differenzieren, und somit zum Erhalt der intestinalen Homöostase beitragen.

4.2.1 Expansion dendritischer Zellen mittels Flt3-Liganden

Die geringe absolute Anzahl LP-DCs im nicht entzündeten Intestinaltrakt *B. vulgatus*- und *E. coli*-monokolonisierter *IL-2*^{-/-}-Mäuse erschwerte die gleichzeitige Durchführung der intrazellulären Zytokinfärbungen und der CD11c⁺-Zellisolation mit anschließender mRNA-Analyse. Daher wurden *E. coli*- und *B. vulgatus*-monokolonisierte Mäuse subkutan mit einer Tumorzelllinie behandelt, die konstitutiv stabilen Flt3-L exprimiert. Flt3-Liganden wirken in einer frühen Entwicklungsphase auf hämatopoetische Vorläuferzellen. Sie unterstützen die Erhaltung, sowie die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen (D'Amico & Wu 2003; Karsunky *et al.* 2003; Shortman & Naik 2007). Die Behandlung von Mäusen und Menschen mit Flt3-L führt zur außergewöhnlichen Expansion der DCs (Maraskovsky *et al.* 1996; Maraskovsky *et al.* 2000). Die Expansion dendritischer Zellen ermöglichte die Identifizierung neuer Subpopulationen und erleichterte die Untersuchung ihrer Funktionen (Maraskovsky *et al.* 1996). Es wird allerdings noch immer kontrovers diskutiert, ob die Expansion dendritischer Zellen eine Veränderung der Subpopulationen und der Maturation bewirkt.

In vitro konnte gezeigt werden, dass durch Flt3-L die Bildung von pDCs und konventionellen DCs (cDCs) gefördert wird. Diese DCs exprimierten nur geringfügig

MHC-II, CD40, CD80 und CD86 und entsprachen damit dem immaturren Zustand unbehandelter Milz-DCs (Naik *et al.* 2006). *In vivo* wurden jedoch in der Milz Flt3-L-expandede DCs mit einem maturaen Phänotyp beobachtet. Diese Milz-DCs zeigten auch eine Änderungen in der Verteilung der Subpopulationen (Maraskovsky *et al.* 1996; Pulendran *et al.* 1997; Shurin *et al.* 1997). Viney *et al.* konnten dagegen immature, Flt3-L-expandede DCs aus der Lamina propria isolieren. Die Stimulation mit LPS *in vivo* führte zu einer erhöhten Expression der Aktivierungsmarker und zur Maturation der DCs (Viney *et al.* 1998). Chirido *et al.* zeigten ebenfalls immature, Flt3-L-expandede LP-DCs. Zusätzlich beobachtete diese Gruppe aber nur geringfügige Änderungen in der Verteilung der DC-Subpopulationen (Chirido *et al.* 2005).

Auch in dieser Arbeit konnte in Flt3-L-expandeden LP-DCs eine geringfügige Änderung in der Verteilung der Subpopulationen in Richtung CD11c⁺B220⁺-Zellen beobachtet werden. Den Hauptanteil der CD11c⁺-Population machten aber noch immer mDCs aus, die keine Änderung hinsichtlich der Expression von CD40, CCR7 und MHC-II zeigten. Es ist daher zu erwarten, dass Flt3-L-expandede LP-DCs ein ähnliches Zytokinmuster produzieren wie naive LP-DCs.

4.2.2 Pro- und antiinflammatorische Wirkungen von IL-6

Der Einfluss von IL-6 auf die Induktion einer Kolitis (Atreya *et al.* 2000; Naito *et al.* 2004; Yamamoto *et al.* 2000), sowie auf die T-Zell Differenzierung (Diehl & Rincon 2002; Diehl *et al.* 2000; Murphy *et al.* 2000) wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht. Es werden sowohl anti- als auch proinflammatorische Eigenschaften des Zytokins beschrieben.

Eine proinflammatorische Wirkung von IL-6 ist hauptsächlich in murinen Kolitismodellen zu beobachten. Im TNBS (*trinitrobenzene sulfonic acid*)-induzierten Kolitismodell, im *IL-10*^{-/-}-Mausmodell, sowie im *SCID*^{-/-}-T-Zelltransfermodell konnte durch die Behandlung mit Antikörpern gegen IL-6-Rezeptoren (anti-IL6R mAk) eine Kolitisinduktion verhindert werden (Atreya *et al.* 2000; Yamamoto *et al.* 2000). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass *IL-6*^{-/-}-Mäuse gegenüber einer DSS (*dextran sulfate sodium*)-induzierten Kolitis weniger anfälliger waren als WT-Mäuse (Naito *et al.* 2004).

Antiinflammatorische Einflüsse von IL-6 werden dagegen hinsichtlich der T-Zell-Differenzierung beschrieben. Zum Beispiel führte die IL-6-Stimulation von T-Zellen zur IL-4 Sekretion und einer Th2-Polarisierung (Diehl & Rincon 2002; Murphy *et al.* 2000). In einer weiteren Studie führte IL-6 in CD4⁺-Zellen zur Hochregulation von SOCS1 (*suppressor of*

cytokine signaling). SOCS1 inhibiert den IFN- γ -Signalweg und verhindert dadurch eine Th1-Differenzierung der T-Zellen. Dementsprechend wird durch IL-6 das Th1/Th2-Gleichgewicht eher in Richtung Th2 verschoben (Diehl *et al.* 2000).

Die Kolitisinduktion in SPF-kolonisierten *IL-2^{-/-}*-Mäusen ist durch eine Th1-Antwort der CD4⁺-T-Zellen charakterisiert (Ehrhardt *et al.* 1997; Sadlack *et al.* 1995; Simpson *et al.* 1995). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass LP-DCs *B. vulgatus*-kolonisierter Tiere IL-6 produzieren. Übereinstimmend mit den beschriebenen antiinflammatorischen Einflüssen in der Literatur wäre eine Suppression der Th1-Antwort durch IL-6 denkbar und könnte neben anderen Mechanismen zusätzlich zur Inhibition der Kolitis in *B. vulgatus*-monokolonisierten und *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierten Tieren führen.

Weitere immunregulierende Eigenschaften durch IL-6 wurden in DCs beobachtet. Park *et al.* zeigten, dass WT-Mäuse besonders nach LPS-Stimulation eine signifikant höhere Anzahl immaturer DCs aufweisen als *IL-6^{-/-}*-Mäuse. Durch weitere Versuche konnte demonstriert werden, dass die Maturation dendritischer Zellen durch STAT3 (*signal transducer and activator of transcription*) verhindert wurde. STAT3 spielt als Signaltransmitter im IL-6-Signalweg eine zentrale Rolle (Park *et al.* 2004). Die Induktion des IL-6-STAT3-Signalweges aktiviert das lysosomale Enzym, Cathepsin S. Dieses Enzym vermindert die intrazelluläre Expression von H2-DM und MHC-II $\alpha\beta$ Dimer in DCs und führt daher zu einer abgeschwächten T-Zellaktivierung (Kitamura *et al.* 2005).

Ein weiterer Hinweis, dass IL-6 an der Differenzierung dendritischer Zellen beteiligt ist, zeigte eine *in vitro* Studie, in der DCs mit IL-6 vorstimuliert und anschließend mit LPS restimuliert wurden. Der durch IL-6-induzierte intermediäre Phänotyp zeigte eine reduzierte Expression des CCR7-Rezeptors, damit verbunden ein vermindertes Migrationspotential und eine geringere Responsivität, die durch eine reduzierte T-Zell-Aktivierung bestätigt wurde (Hegde *et al.* 2004). Dieser beschriebene DC-Phänotyp ähnelt bezüglich der Aktivierungsmarker und der T-Zell-Aktivierung dem beschriebenen *B. vulgatus*-induzierten semi-maturen Phänotyp (Frick *et al.* 2006).

Es wurde in dieser Arbeit geprüft, ob *B. vulgatus*-stimulierte, semi-mature DCs im Vergleich zu *E. coli*-stimulierten DCs eine reduzierte Expression des CCR7-Rezeptors, ein vermindertes Migrationspotential und eine geringere Responsivität gegenüber LPS zeigen. Um den Einfluss von IL-6 zu untersuchen, wurden die Versuche auch mit *IL-6^{-/-}*-DCs durchgeführt.

B. vulgatus-stimulierte DCs zeigten im Vergleich zu *E. coli*-stimulierten DCs eine geringere CCR7 mRNA-Expression und eine geringere Expression von CCR7-Rezeptoren auf

der Zelloberfläche. Die biologische Relevanz dieser reduzierten CCR7-Expression zeigte sich durch ein vermindertes Migrationspotential der *B. vulgatus*-stimulierten DCs im Vergleich zu *E. coli*-stimulierten DCs. Auch bezüglich der Restimulation mit LPS zeigten *B. vulgatus*-stimulierte DCs eine signifikante Reduktion der TNF- α Produktion verglichen mit nativen DCs. Alle funktionellen Einschränkungen der *B. vulgatus*-stimulierten DCs waren in *B. vulgatus*-stimulierten *IL-6*^{-/-}-DCs aufgehoben.

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass *B. vulgatus*-induzierte semi-mature DCs bezüglich der funktionellen Eigenschaften mit dem von Hegde *et al.* beobachteten intermediären DC-Phänotyp übereinstimmen. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die funktionellen Einschränkungen der *B. vulgatus*-induzierten semi-maturen DCs IL-6-abhängig sind. Die Stimulation dendritischer Zellen mit geringen Konzentrationen an TLR-Liganden induzierte ebenfalls semi-mature DCs, die tolerant gegenüber weitere Stimuli waren. Die Toleranzinduktion in diesen DCs war IL-6 abhängig und in *IL-6*^{-/-}-DCs nicht mehr zu beobachten (Geisel *et al.* 2007).

IL-6 scheint demnach auf DCs eine modulierende Wirkung zu haben, die sich in einer reduzierten Maturationsfähigkeit und in funktionellen Einschränkungen zeigt. Die erhöhte IL-6-Produktion LP-DCs *B. vulgatus*-kolonisierter Tiere *in vivo*, sowie die *in vitro* Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass *B. vulgatus* IL-6 abhängig semi-mature DCs induziert.

4.3 Reduziertes Migrationspotential semi-maturer dendritischer Zellen

Nachdem *B. vulgatus*-induzierte semi-mature DCs *in vitro* eine reduzierte CCR7-Expression verbunden mit einer verminderten Migrationsfähigkeit zeigten, wurde untersucht, ob semi-mature LP-DCs *B. vulgatus*-monokolonisierter Tiere auch ein reduziertes Migrationspotential aufweisen. Die Migration LP-DCs wurde in dieser Arbeit durch die Bestimmung der DC-Anzahl in der Lamina propria und in den mesenterialen Lymphknoten, der Bestimmung der Aktivierungsmarker mesenterialer Lymphknoten-DCs (mLK-DCs), sowie durch die CCR7-Expression in der LP- und mLK-DCs untersucht.

4.3.1 Erhöhte Anzahl dendritischer Zellen in der Lamina propria *B. vulgatus* monokolonisierter *IL-2*^{-/-}-Mäuse

Die isolierte Leukozytenzahl aus dem Gesamtdarm der SPF-kolonisierten Mäusen, die bereits schwere Entzündungen im Darm zeigten, war signifikant erhöht im Vergleich zu den

anderen Versuchsgruppen. Bei der Untersuchung des prozentualen Anteils dendritischer Zellen an der Leukozytenzahl wurden in *B. vulgatus*-monokolonisierten, *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien Mäusen ähnliche Anteile gefunden. *E. coli*-monokolonisierte und SPF-kolonisierte Tiere zeigten dagegen einen signifikant geringen prozentualen Anteil.

Die signifikant höhere Leukozytenzahl der SPF-kolonisierten Tiere im Vergleich zu den anderen Mausgruppen ist durch die starke intestinale Entzündung dieser Tiere zum Zeitpunkt der Untersuchung bedingt. Auch andere Arbeitsgruppen konnten in murinen Kolitismodellen einen starken Anstieg der Leukozyten in erkrankten Mäusen beobachten. Dabei weist die erhöhte Leukozytenzahl auf eine bereits stattgefundene Infiltration verschiedener Immunzellen in das entzündete Gewebe hin (Cruickshank *et al.* 2005; Krajina *et al.* 2003). Der signifikant geringere prozentuale Anteil LP-DCs *E. coli*- und SPF-kolonisierter Tiere im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen könnte durch eine bereits stattgefundenen Migration der DCs in die mesenterialen Lymphknoten erklärt werden. Die Angaben in der Literatur bezüglich des prozentualen Anteils dendritischer Zellen an der Leukozytenzahl schwanken in der Literatur beträchtlich (Chirido *et al.* 2005; Cruickshank *et al.* 2005; Jang *et al.* 2006). Die Ergebnisse dieser Arbeit liegen im beschriebenen Bereich.

Die absoluten Zahlen CD11c positiver Zellen wurden zur Überprüfung des reduzierten prozentualen Anteils dendritischer Zellen in *E. coli*- und SPF-kolonisierten Tieren bestimmt. *E. coli*-monokolonisierte Tiere zeigten eine geringere absolute CD11c⁺-Zellzahl als *B. vulgatus*-monokolonisierte, *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierte und keimfreie Mäuse. In SPF-kolonisierte Tiere wurde dagegen eine vergleichbare absolute Zellzahl zu den protektiven Versuchsgruppen berechnet.

In *E. coli*-kolonisierten Tieren sind sowohl prozentual, wie auch absolut eindeutig weniger LP-DCs als in *B. vulgatus*-kolonisierten und keimfreien Tieren vorhanden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *E. coli*-monokolonisierte und SPF-kolonisierte LP-DCs zu einem murenen Phänotyp differenzieren, während LP-DCs der *B. vulgatus*-monokolonisierten und *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierten Tiere eine unvollständige Aktivierung und Maturation zeigten. Es ist daher denkbar, dass die maturierten LP-DCs der *E. coli*-monokolonisierten Tiere in die mesenterialen Lymphknoten migrieren, während semi-mature LP-DCs der *B. vulgatus*-kolonisierten Tiere in der Lamina propria ruhen und vergleichbar mit LP-DCs im nicht-entzündlichen Zustand nur ein geringes Migrationsverhalten in die mesenterialen Lymphknoten zeigen (Jang *et al.* 2006). Diese Vermutung wird durch die ähnliche prozentuale und absolute Anzahl LP-DCs *B. vulgatus*-kolonisierter Tieren mit LP-DCs keimfreier Tiere bestärkt.

Im entzündeten Gewebe SPF-kolonisierter Mäuse würde man nach dieser Hypothese eine deutliche Migration der muren LP-DCs in die mesenterialen Lymphknoten vermuten. Die absoluten CD11c⁺-Zellen in der Lamina propria sind in diesen Tieren jedoch vergleichbar mit *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierten, bzw. geringfügig niedriger als in den *B. vulgatus*-monokolonisierten und keimfreien Tieren. Eine Erklärung dafür könnte die Migration von Immunzellen aus anderen Geweben sein, die durch die vermehrte Zytokinausschüttung der Leukozyten im entzündeten Geweben angezogen werden (Medzhitov & Janeway, Jr. 1997). Es ist denkbar, dass in SPF-kolonisierten Tieren DCs aus anderen Geweben bereits zu den entzündlichen Arealen migriert sind, wodurch sich die absolute Anzahl DCs erhöht (Abb. 21).

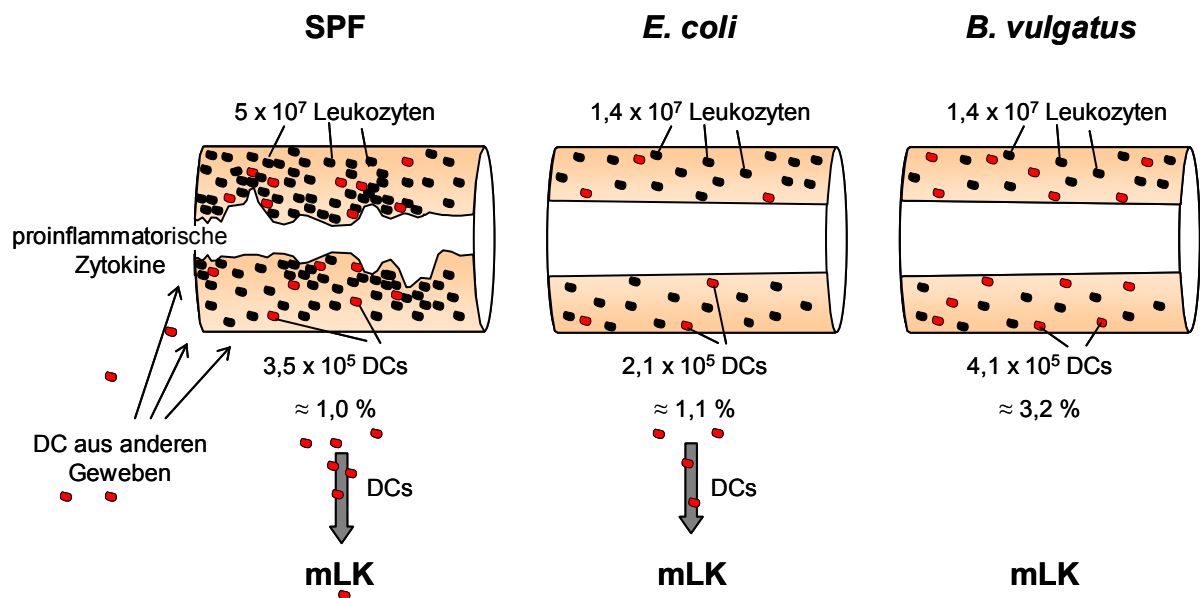


Abb. 21: Darstellung der absoluten Zellzahlen von Leukozyten und LP-DCs, sowie der prozentuale Anteil dendritischer Zellen an der Leukozytenzahl in der Lamina propria. Im entzündeten Darm SPF-kolonisierter Tiere sind bereits Leukozyten eingewandert, während im nicht-entzündeten Zustand der *E. coli*- und *B. vulgatus*-monokolonisierten Tiere nur wenig Leukozyten vorhanden sind. Aufgrund des geringen prozentualen DC-Anteils, sowie der geringen absoluten Zellzahl wird vermutet, dass die aktivierten und maturierten LP-DCs *E. coli*- und SPF-kolonisierter Tiere bereits in die mesenterialen Lymphknoten gewandert sind, während DCs *B. vulgatus*-monokolonisierter Tiere in der Lamina propria ruhen (hoher prozentualer DC-Anteil und hohe absolute LP-DC-Zahl). SPF-kolonisierte Tiere könnten durch den Einstrom dendritischer Zellen aus anderen Geweben eine höhere absolute Anzahl CD11c⁺-Zellen zeigen, als *E. coli*-monokolonisierte Tiere. Schwarze Punkte: Leukozyten; rote Punkte: DCs; mLK: mesenteriale Lymphknoten.

4.3.2 Anzahl dendritischer Zellen in den mesenterialen Lymphknoten

Um zu überprüfen, ob LP-DCs der *E. coli*- und SPF-kolonisierten *IL-2*^{-/-}-Mäuse in die mesenterialen Lymphknoten migrieren, wurde die Anzahl der mesenterialen Lymphknoten-DCs (mLK-DCs) bestimmt. Zwischen den einzelnen Mausgruppen konnten bezüglich des

prozentualen Anteils dendritischer Zellen keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden. Die Berechnung der absoluten Zellzahl CD11c⁺-Zellen zeigte in *E. coli*-, *B. vulgatus*-monokolonisierten, *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien Mäusen eine ähnliche Anzahl, während SPF-kolonisierten Mäuse eine erhöhte Anzahl CD11c⁺-Zellen aufwiesen.

In der Literatur liegt der prozentuale Anteil CD11c⁺-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten mit ~1 % (Cruickshank *et al.* 2005; Walton *et al.* 2006) knapp über den Werten in dieser Arbeit. Die ähnlichen DC-Anteile der unterschiedlichen Mausgruppen stimmen mit den bisherigen Vermutungen nicht überein. Aufgrund der DC-Anzahl in der Lamina propria, wurde eine vermehrte Migration Lamina propria-dendritischer Zellen *E. coli*- und SPF-kolonisierter Tiere in die mesenterialen Lymphknoten angenommen, die folglich zu einem höheren prozentualen Anteil mLK-DCs in *E. coli*- und SPF-kolonisierten Tieren im Vergleich zu *B. vulgatus*-kolonisierten und keimfreien Tieren hätte führen müssen.

Eine mögliche Erklärung für den nicht erhöhten prozentualen Anteil mLK-DCs in *E. coli*- und SPF-kolonisierten Tieren könnte die begrenzte Lebensdauer maturer DCs sein. In der Literatur ist wenig über den Verbleib dendritischer Zellen nach T-Zell-Aktivierung bekannt. Studien weisen auf eine Apoptose-Induktion dendritischer Zellen durch aktivierte T-Zellen hin. *In vivo* konnte mittels Immunhistologie dargestellt werden, dass injizierte, fluoreszierende, naive DCs deutlich länger in den Lymphknoten blieben als injizierte, fluoreszierende, antigenpräsentierende DCs (Ingulli *et al.* 1997). Nachfolgende *in vitro*-Studien konnten beweisen, dass antigenpräsentierende DCs nach der Stimulation spezifischer T-Zellen bereits nach 8 h in Apoptose gingen, während immature DCs keine Anzeichen von Apoptose zeigten (Matsue *et al.* 1999; Matsue & Takashima 1999).

Die Berechnung der absoluten CD11c⁺-Zellzahl in den mesenterialen Lymphknoten zeigte in SPF-kolonisierten Tieren gegenüber *E. coli*-, *B. vulgatus*-monokolonisierten, *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien Mäusen deutlich mehr CD11c⁺-Zellen. Die fortgeschrittene Entzündung der SPF-kolonisierten Tiere lockt vermutlich auch DCs aus anderen Geweben in die Lamina propria. Nach Antigenaufnahme in der Lamina propria, wandern diese DCs in die mesenterialen Lymphknoten. Dies könnte zu der erhöhten absoluten Anzahl dendritischer Zellen in den mesenterialen Lymphknoten führen. Eine erhöhte DC-Anzahl in den mesenterialen Lymphknoten konnten auch andere Arbeitsgruppen in kolitogenen SPF-kolonisierten Mäusen zeigen (Krajina *et al.* 2003).

4.3.3 Expression der Aktivierungsmarker dendritischer Zellen in den mesenterialen Lymphknoten

Neben der Anzahl dendritischer Zellen in den mesenterialen Lymphknoten wurde in allen Versuchsgruppen die Aktivierung und Maturation dendritischer Zellen anhand der Expression von CD40 und MHC-II untersucht. Unabhängig von der Kolonisierung zeigten alle mLK-DCs eine erhöhte Expression von CD40 und MHC-II.

Nach der bisherigen Hypothese sollten durch die Migration der muren LP-DCs in die mesenterialen Lymphknoten mLK-DCs *E. coli*- und SPF-kolonisierter Tiere eine höhere Expression der Aktivierungsmarker als *B. vulgatus*-kolonisierte und keimfreie Tiere zeigen. In den mesenterialen Lymphknoten befinden sich jedoch unterschiedliche DC-Populationen, die sich unter anderem bezüglich ihres Aktivierungszustandes unterscheiden. Einen gewissen Anteil machen dabei eingewanderte, aktivierte LP-DCs aus (Huang & MacPherson 2001). Neben diesen konventionellen, migratorischen DCs existieren zusätzlich noch lymphoide, geweberesistente DCs, deren Aufenthaltsort auf die mesenterialen Lymphknoten beschränkt ist. Es wird vermutet, dass geweberesistente DCs eine wichtige Rolle bei der Induktion tolerogener T-Zellen spielen (Shortman & Naik 2007). Diese geweberesistenten DCs gehören oftmals der gleichen DC-Subpopulation an wie migratorischen DCs, befinden sich jedoch in einem immaturren Zustand (Henri *et al.* 2001; Shortman & Naik 2007; Wilson *et al.* 2003). Bei der Untersuchung der Aktivierungsmarker dendritischer Zellen im gesamten Lymphknoten werden daher mature, migratorische DCs und immaturre, geweberesistente DCs analysiert (Lindquist *et al.* 2004; Wilson *et al.* 2003). Dadurch sind die Aktivierungszustände der eingewanderten DCs nicht eindeutig zu bestimmen. Auch in der Literatur finden sich widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des Aktivierungszustandes der mLK-DCs. Walton *et al.* konnten in unbehandelten keimfreien und SPF-Mäusen mLK-DCs mit einem MHC-II^{int}CD86^{lo}CD40^{lo} Phänotyp identifizieren (Walton *et al.* 2006), während andere Studien einen aktivierten DC-Phänotyp in den mesenterialen Lymphknoten zeigten (Henri *et al.* 2001; Jang *et al.* 2006). Cruickshank *et al.* beobachteten, übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in kolitogenen SPF-*IL-2*^{-/-}-Mäusen, aber auch in entzündungsfreien, keimfreien *IL-2*^{-/-}- und in WT-Mäusen (SPF und keimfrei) erhöhte Aktivierungsmarker der mLK-DCs (Cruickshank *et al.* 2005). Die Aktivierung der mLK-DCs *B. vulgatus*-kolonisierter und keimfreier Tiere ist wahrscheinlich durch die Aufnahme von LPS und anderen Bakterienbestandteilen im autoklavierten Futter und Streu bedingt.

4.3.4 CCR7-Expression dendritischer Zellen in der Lamina propria und in den mesenterialen Lymphknoten

Es ist beschrieben, dass aktivierte DCs nach Antigenaufnahme in die sekundären Lymphorgane wandern und dort naive T-Zellen aktivieren (Kobayashi *et al.* 2004). Die Migration der DCs in die Lymphknoten wird durch die Expression von CCR7 induziert. CCR7 bindet an die beiden Chemokine CCL19 und CCL21 (Forster *et al.* 1999; Yanagihara *et al.* 1998). CCL21 wird im lymphatischen Endothel (Banchereau & Steinman 1998; Sallusto *et al.* 1998) sezerniert, während CCL19 hauptsächlich in den T-Zell-Zonen der sekundären Lymphorgane produziert wird und die Anordnung der DCs in den T-Zell-Zonen koordiniert (Baekkevold *et al.* 2001). Der CCR7-Rezeptor wird während des Reifungsprozesses dendritischer Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert.

Eine mögliche Erklärung der Kolitisprävention *B. vulgatus*-monokolonisierter und kokolonisierter Mäuse ist die verminderte Migration semi-maturer LP-DCs in die mesenterialen Lymphknoten. Da CCR7 für die Migration der DCs in die mesenterialen Lymphknoten essentiell ist, wurde die CCR7-Expression auf LP-DCs und mLK-DCs in allen Versuchsgruppen untersucht.

Die CCR7-Expression der intestinalen LP-DCs war unabhängig von den untersuchten Mausgruppen sehr gering. Dagegen konnte in den mesenterialen Lymphknoten eine signifikante Erhöhung der CCR7-Expression auf DCs *E. coli*- und SPF-kolonisierter Mäuse im Vergleich zu *B. vulgatus*-monokolonisierten, *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierten und keimfreien Mäusen festgestellt werden.

Die geringe CCR7-Expression mLK- und LP-DCs *B. vulgatus*-monokolonisierter und *E. coli*/*B. vulgatus*-kokolonisierter Tiere unterstützt die Vermutung, dass semi-maturen LP-DCs deutlich weniger in die mesenterialen Lymphknoten migrieren als die aktivierten und maturierten LP-DCs *E. coli*- und SPF-kolonisierter Mäuse, die eine erhöhte CCR7-Expression der mLK-DCs zeigten. Die niedrige CCR7-Expression der LP-DCs *E. coli*- und SPF-kolonisierter Mäuse stimmt mit der niedrigen prozentualen Anzahl dendritischer Zellen in der Lamina propria dieser Mäuse überein. Beide Ergebnisse weisen auf eine bereits stattgefundenen Migration der LP-DCs hin.

Allerdings waren die prozentualen Anteile CD11c⁺-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten *E. coli*- und SPF-kolonisierter Mäuse im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen nicht erhöht. Dieses Resultat wurde durch die begrenzte Lebenszeit der migrierten, antigenpräsentierenden LP-DCs erklärt. Es wurde vermutet, dass T-Zellen nach erfolgter Stimulation in diesen DCs Apoptose induzieren. CCR7⁺-DCs in den mesenterialen

Lymphknoten sind bereits maturiert und sollten durch die T-Zell-induzierte Apoptose der DCs nicht mehr analysiert werden können. Dies steht scheinbar im Widerspruch zur erhöhten CCR7-Expression der mLK-DCs. Jedoch induzieren T-Zellen Apoptose erst nach einer erfolgten Stimulation (Ingulli *et al.* 1997; Matsue *et al.* 1999). Migrierte CCR7⁺-LP-DCs, die gerade T-Zellen stimulieren, werden demnach im FACS als CCR7⁺-Zellen detektiert und können zu der erhöhten CCR7-Expression in den mesenterialen Lymphknoten führen.

4.4 Interaktion Lamina propria-dendritischer Zellen mit Bakterien

Immer noch offen ist die Frage welche Rezeptoren für die Interaktion der luminalen Bakterien mit dem Mukosa-assoziierten Immunsystem verantwortlich sind. Eine bedeutende Rolle bei der Induktion von Immunantworten gegen gramnegative Bakterien (wie z.B. *B. vulgatus* oder *E. coli*) spielen TLR4 und TLR2, die unter anderem für die Erkennung von Lipopolysacchariden zuständig sind. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Modulation Lamina propria-dendritischer Zellen in *IL-2*^{-/-}-Mäusen wäre die Stimulation von *B. vulgatus* über TLR2, während *E. coli*-LP-DCs über TLR4 stimuliert werden könnten.

Es ist beschrieben, dass aufgereinigtes LPS der Familie *Enterobacteriaceae* eher TLR4 als TLR2 Rezeptoren aktiviert und zu einer sehr starken Immunantwort führt (Means *et al.* 1999). Bestätigt wurde dies durch synthetisch hergestelltes *E. coli* Lipid A, dass fast ausschließlich über TLR4 Signale induziert (Hirschfeld *et al.* 2000). Dagegen ist *B. vulgatus* phylogenetisch eng verwandt mit *Porphyromonas gingivalis*. Es konnte gezeigt werden, dass LPS von *P. gingivalis* (Hirschfeld *et al.* 2001) oder *Bacteroides fragilis* (Erridge *et al.* 2004) wahrscheinlich über TLR2 vermittelt wird. LPS von *P. gingivalis* induzierte eine geringere biologische Aktivität im Vergleich zu enterobakteriellem LPS (Hirschfeld *et al.* 2001; Nair *et al.* 1983).

Zudem konnte in DCs bereits gezeigt werden, dass die Stimulation von TLR4 und TLR2 zu einer unterschiedlichen Zytokinproduktion führte. Nach der Stimulation von TLR4 wurde IL-12(p70) und IFN- γ induzierbarem Protein-10 (IP-10) analysiert und damit verbunden eine Th1-Antwort, während die Stimulation von TLR2 zur Produktion von IL-12(p40) homodimer und IL-10 führte (Re & Strominger 2004; Re & Strominger 2001). Die Stimulation dendritischer Zellen mit P3C (Pam3CysS(K)₄), das als synthetischer Ligand zur Stimulation von TLR2 eingesetzt wird, resultierte in einer, im Verhältnis zur TNF- α Sekretion, gesteigerten Produktion von IL-6. Dieses produzierte IL-6/TNF- α -Verhältnis konnte auch durch die Stimulation dendritischer Zellen mit *B. vulgatus* beobachtet werden. Dagegen

produzierten *E. coli* stimulierte DCs ein ähnliches IL-6/TNF- α -Verhältnis wie mit LPS stimulierten DCs (Geisel 2006).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Kolitisinduktion in *IL-2*^{-/-}-Mäusen unabhängig von einer Aktivierung der TLRs stattfindet, da *IL-2*^{-/-} x *MyD88*^{-/-} x *TRIF*^{-/-} dreifach-defiziente Mäuse eine Kolitis entwickelten (Rakoff-Nahoum *et al.* 2006). MyD88 und TRIF sind Adapter-Moleküle der TLRs, die für den TLR-Signalweg benötigt werden. Die untersuchten *IL-2*^{-/-}-Mäuse waren jedoch im Gegensatz der in dieser Arbeit verwendeten Tiere auf einem Black 6 (BL/6) Hintergrund. Es ist nicht gesichert, ob auch in diesem Mausmodell *B. vulgatus* einen protektiven Effekt auf die Kolitisinduktion ausübt. TLRs, sowie andere PRRs, könnten somit in *IL-2*^{-/-}-Mäusen mit C57BL/6 x 129/Ola Mischhintergrund mitverantwortlich für die Entwicklung der Kolitis sein.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein semi-maturer Phänotyp Lamina propria-dendritischer Zellen *B. vulgatus*-kolonisierter Tiere bestimmt werden. Vermutlich induziert *B. vulgatus* die Differenzierung semi-maturer LP-DCs in Abhängigkeit von IL-6. Die erhöhte Anzahl dendritischer Zellen in der Lamina propria und die geringe CCR7-Expression der LP-DCs und mLK-DCs *B. vulgatus*-monokolonisierter und *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierter Tiere deutet auf eine verminderte Migration dieser DCs in die mesenterialen Lymphknoten hin. Dies könnte zu der beobachteten reduzierten T-Zell-Aktivierung *B. vulgatus*-kolonisierter Tiere führen und damit die Kolitisprävention in *B. vulgatus*-monokolonisierten und *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierten *IL-2*^{-/-}-Tieren erklären.

5 Zusammenfassung

Im IL-2-defizienten Mausmodell entwickeln Mäuse unter SPF-Bedingungen eine ausgeprägte Kolitis, während Tiere unter keimfreien Bedingungen gesund bleiben (Contractor *et al.* 1998; Ehrhardt *et al.* 1997; Waidmann *et al.* 2003). Die Monokolonisierung mit *E. coli* führt zu einer Kolitisentwicklung, während *B. vulgatus*-monokolonisierte Tiere gesund bleiben. In kokolonisierten Tieren konnte *B. vulgatus* die durch *E. coli* induzierte Kolitis verhindern (Waidmann *et al.* 2003).

Es wurde untersucht, ob die Monokolonisierung von *E. coli* oder *B. vulgatus* zu einer unterschiedlichen Modulation dendritischer Zellen in der Lamina propria (LP-DCs) hinsichtlich der Aktivierung und Maturation, der DC Anzahl, der Lokalisation und der DC Subpopulationen führt. Keimfreie und SPF kolonisierte Mäuse dienten dabei als Referenztiere. LP-DCs *B. vulgatus* monokolonisierter und *E. coli/B. vulgatus* kokolonisierter *IL-2^{-/-}*-Tiere zeigten einen semi-maturen Phänotyp (CD40^{lo}CD80^{lo}CD86^{lo}MHCII^{hi}), während die Monokolonisierung mit *E. coli* bereits vor Krankheitsbeginn zu aktivierten und maturierten LP-DCs (CD40^{hi}CD80^{hi}CD86^{hi}MHCII^{hi}) führte.

E. coli- und SPF-kolonisierte Tiere zeigten eine reduzierte Anzahl LP-DCs und eine erhöhte Anzahl CCR7⁺-DCs in den mesenterialen Lymphknoten im Vergleich zu *B. vulgatus*-kolonisierten und keimfreien Tieren. Hinsichtlich der Aktivierung von Lamina propria-T-Zellen polarisierten mature DCs T-Zellen in Richtung Th1, während semi-mature DCs keine Th-Antwort induzierten. Die untersuchten DCs im Lymphknoten zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der Expression der Aktivierungsmarker und der DC-Anzahl zwischen *E. coli*-monokolonisierten und *B. vulgatus*-kolonisierten Tieren.

Die Induktion semi-maturer DCs wurde *in vitro* durch IL-6 beschrieben (Frick *et al.* 2006; Geisel *et al.* 2007; Hegde *et al.* 2004). In dieser Arbeit zeigten *B. vulgatus* stimulierte, semi-mature DCs eine reduzierte CCR7 Expression und DC-Migration. Beide funktionellen Einschränkungen waren in *B. vulgatus* stimulierten *IL-6^{-/-}*-DCs aufgehoben. *In vivo* konnte eine erhöhte IL-6 mRNA und Proteinexpression in intestinalen LP-DCs der *B. vulgatus*-monokolonisierten Tiere im Vergleich zu *E. coli*-monokolonisierten Tieren bestimmt werden. Dagegen war die TNF- α mRNA und Proteinexpression der LP-DCs in *E. coli*-monokolonisierten Tieren höher als in *B. vulgatus*-monokolonisierten Tieren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *B. vulgatus* vermutlich in Abhängigkeit von IL-6 LP-DCs zu einem semi-maturen Phänotyp differenziert, der zu einer reduzierten T-Zell-Aktivierung führt.

Dies könnte die Kolitisprävention *B. vulgatus*-monokolonisierter und *E. coli/B. vulgatus*-kokolonisierter Tieren erklären. IL-6 scheint dabei in Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-12 und TNF- α , als immunregulatorisches Zytokin in Bezug auf intestinale LP-DCs zu wirken.

6 Abkürzungen

Abb.	Abbildung	FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
AICD	<i>activated induced cell death</i>	Flt3-L	<i>FMS-like tyrosine kinase-3 ligand</i>
APC	antigenpräsentierende Zelle	Foxp3	<i>forkhead box P3</i>
APC	<i>allophycocyanine</i>	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphat Dehydrogenase
<i>B. vulgatus</i>	<i>Bacteroides vulgatus</i>	h	Stunden
BHI	<i>brain-heart-infusion</i>	HEV	<i>high endothelial venuel</i>
bzw.	beziehungsweise	ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>	IEL	intraepitheliale Lymphocyten
CCL	Chemokin-Ligand	IFN	Interferon
CCR	Chemokin-Rezeptor	IL	Interleukin
CD	Differenzierungscluster	IFR	intrafollikuläre Region
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	Ig	Immunglobulin
°C	Grad Celsius	<i>IL-2^{-/-}</i>	IL-2-defizient
CTL	zytotoxische T-Zelle	IPEX	<i>x-linked immunodeficiency syndrome</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>	KO	<i>knock-out</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	LB	Luria-Bertani
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol	LFA	lymphocyte function-associated antigen
DC	dendritische Zelle	LP	Lamina propria
DC-CK	<i>dendritic cell-derived chemokine 1</i>	LP-DC	Lamina propria-dendritische Zellen
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate	LPS	Lipopolysaccharid
DSS	Dextransodiumsulfat	LP-T-Zellen	<i>Lamina propria-T-Zellen</i>
DTT	Dithiothreitol	M	molar
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	mAK	monoklonaler Antikörper
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	mDC	myeloide dendritische Zelle
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
FAE	follikular-assoziiertes Epithel		
FcR	Fc-Rezeptor		
FCS	<i>fetal calf serum</i>		

min	Min	s	Sekunden
ml	Milliliter	SCID	severe combined immunodeficiency
mLK-DC	mesenteriale Lymphknoten-dendritische Zellen	SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>	SED	subepithelialer Dom
mpk	Max von Pettenkofer	SPF	spezifisch-pathogenfrei
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene (88)</i>	Stabw.	Standardabweichung
NF-κB	Nucleärer Faktor-κB	STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen	subsp	Subspezies
NLR	<i>nucleotide-binding domain and leucine-rich repeats</i>	Tab.	Tab.
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>	Th	T-Helferzelle
P3C	Pam3CysS(K) ₄ (TLR2 Ligand)	TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	TLR	<i>toll-like receptor</i>
PAMP	pathogen-associated molecular pattern	TNBS	<i>reverse</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>	TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle	TRIF	<i>TIR domain containing adapter inducing interferon-beta</i>
PE	<i>phycoerythrin</i>	TSLP	Thymic stromal-derived lymphopoietin
PercP	<i>peridinin-chlorophyll protein</i>	U	<i>unit</i>
PFA	Paraformaldehyd	UV	Ultraviolett
PI	Propidiumiodid	WT	Wildtyp
PMA	<i>para</i> -Methoxyamphetamin	z.B.	zum Beispiel
PMN	<i>polymorphonuclear leucocyte</i>		
PPs	Peysersche Plaques		
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>		
RAG	<i>recombinase-actiating gene</i>		
RT	Raumtemperatur		
RT-PCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i>		

7 Literaturverzeichnis

- Abbas A.K., Murphy K.M. & Sher A.** (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383, 787-793.
- Adema G.J., Hartgers F., Verstraten R., de V.E., Marland G., Menon S., Foster J., Xu Y., Nooyen P., McClanahan T., Bacon K.B. & Figdor C.G.** (1997). A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature*, 387, 713-717.
- Aggarwal S., Ghilardi N., Xie M.H., de Sauvage F.J. & Gurney A.L.** (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.*, 278, 1910-1914.
- Akira S. & Takeda K.** (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, 4, 499-511.
- Akira S., Uematsu S. & Takeuchi O.** (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- Aliberti J., Reis e Sousa, Schito M., Hieny S., Wells T., Huffnagle G.B. & Sher A.** (2000). CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat. Immunol.*, 1, 83-87.
- Almeida A.R., Legrand N., Papiernik M. & Freitas A.A.** (2002). Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. *J. Immunol.*, 169, 4850-4860.
- Andersen M.H., Schrama D., Thor S.P. & Becker J.C.** (2006). Cytotoxic T cells. *J. Invest Dermatol.*, 126, 32-41.
- Apostolou I. & von B.H.** (2004). In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J. Exp. Med.*, 199, 1401-1408.
- Ardavin C.** (2003). Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 582-590.
- Arnold-Schild D., Hanau D., Spohner D., Schmid C., Rammensee H.G., de la S.H. & Schild H.** (1999). Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J. Immunol.*, 162, 3757-3760.
- Atreya R., Mudter J., Finotto S., Mullberg J., Jostock T., Wirtz S., Schutz M., Bartsch B., Holtmann M., Becker C., Strand D., Czaja J., Schlaak J.F., Lehr H.A., Autschbach F., Schurmann G., Nishimoto N., Yoshizaki K., Ito H., Kishimoto T., Galle P.R., Rose-John S. & Neurath M.F.** (2000). Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat. Med.*, 6, 583-588.
- Autenrieth I.B., Bucheler N., Bohn E., Heinze G. & Horak I.** (1997). Cytokine mRNA expression in intestinal tissue of interleukin-2 deficient mice with bowel inflammation. *Gut*, 41, 793-800.
- Backhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A. & Gordon J.I.** (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307, 1915-1920.
- Baekkevold E.S., Yamanaka T., Palframan R.T., Carlsen H.S., Reinhold F.P., von Andrian U.H., Brandtzaeg P. & Haraldsen G.** (2001). The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J. Exp. Med.*, 193, 1105-1112.
- Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B. & Palucka K.** (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 18, 767-811.
- Banchereau J. & Steinman R.M.** (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-252.
- Baumgart D.C. & Carding S.R.** (2007). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*, 369, 1627-1640.

- Becker C., Wirtz S., Blessing M., Pirhonen J., Strand D., Bechthold O., Frick J., Galle P.R., Autenrieth I. & Neurath M.F.** (2003). Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J. Clin. Invest.*, 112, 693-706.
- Berg R.D.** (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.*, 4, 430-435.
- Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M., Weiner H.L. & Kuchroo V.K.** (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441, 235-238.
- Binder R.J., Anderson K.M., Basu S. & Srivastava P.K.** (2000). Cutting edge: heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c+ cells in vivo. *J. Immunol.*, 165, 6029-6035.
- Bluestone J.A. & Abbas A.K.** (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 253-257.
- Bocci V.** (1992). The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role. *Perspect. Biol. Med.*, 35, 251-260.
- Boirivant M., Fuss I.J., Chu A. & Strober W.** (1998). Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J. Exp. Med.*, 188, 1929-1939.
- Bonen D.K. & Cho J.H.** (2003). The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 124, 521-536.
- Brocker T.** (1997). Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 186, 1223-1232.
- Brunkow M.E., Jeffery E.W., Hjerrild K.A., Paepfer B., Clark L.B., Yasayko S.A., Wilkinson J.E., Galas D., Ziegler S.F. & Ramsdell F.** (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.*, 27, 68-73.
- Cella M., Sallusto F. & Lanzavecchia A.** (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 9, 10-16.
- Chamaillard M., Hashimoto M., Horie Y., Masumoto J., Qiu S., Saab L., Ogura Y., Kawasaki A., Fukase K., Kusumoto S., Valvano M.A., Foster S.J., Mak T.W., Nunez G. & Inohara N.** (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.*, 4, 702-707.
- Chamberlin W., Graham D.Y., Hulten K., El-Zimaity H.M., Schwartz M.R., Naser S., Shafran I. & El-Zaatari F.A.** (2001). Review article: Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 15, 337-346.
- Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K.J., Li L., Marinos N., McGrady G. & Wahl S.M.** (2003). Conversion of peripheral CD4+. *J. Exp. Med.*, 198, 1875-1886.
- Chicha L., Jarrossay D. & Manz M.G.** (2004). Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations. *J. Exp. Med.*, 200, 1519-1524.
- Chiodini R.J., Van Kruiningen H.J., Thayer W.R., Merkal R.S. & Coutu J.A.** (1984). Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.*, 29, 1073-1079.
- Chirido F.G., Millington O.R., Beacock-Sharp H. & Mowat A.M.** (2005). Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *Eur. J. Immunol.*, 35, 1831-1840.
- Cho J.H. & Abraham C.** (2007). Inflammatory bowel disease genetics: Nod2. *Annu. Rev. Med.*, 58, 401-416.

- Collins M.T., Lisby G., Moser C., Chicks D., Christensen S., Reichelderfer M., Hoiby N., Harms B.A., Thomsen O.O., Skibsted U. & Binder V.** (2000). Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in patients with inflammatory bowel disease and in controls. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 4373-4381.
- Contractor N.V., Bassiri H., Reya T., Park A.Y., Baumgart D.C., Wasik M.A., Emerson S.G. & Carding S.R.** (1998). Lymphoid hyperplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice. *J. Immunol.*, 160, 385-394.
- Corazza N., Eichenberger S., Eugster H.P. & Mueller C.** (1999). Nonlymphocyte-derived tumor necrosis factor is required for induction of colitis in recombination activating gene (RAG)2(-/-) mice upon transfer of CD4(+)CD45RB(hi) T cells. *J. Exp. Med.*, 190, 1479-1492.
- Cruickshank S.M., English N.R., Felsburg P.J. & Carding S.R.** (2005). Characterization of colonic dendritic cells in normal and colitic mice. *World J. Gastroenterol.*, 11, 6338-6347.
- D'Amico A. & Wu L.** (2003). The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J. Exp. Med.*, 198, 293-303.
- Darfeuille-Michaud A., Neut C., Barnich N., Lederman E., Di M.P., Desreumaux P., Gambiez L., Joly B., Cortot A. & Colombel J.F.** (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 115, 1405-1413.
- de Jong E.C., Vieira P.L., Kalinski P., Schuitemaker J.H., Tanaka Y., Wierenga E.A., Yazdanbakhsh M. & Kapsenberg M.L.** (2002). Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J. Immunol.*, 168, 1704-1709.
- Didierlaurent A., Sirard J.C., Kraehenbuhl J.P. & Neutra M.R.** (2002). How the gut senses its content. *Cell Microbiol.*, 4, 61-72.
- Diebold S.S., Kaisho T., Hemmi H., Akira S. & Reis e Sousa** (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 303, 1529-1531.
- Diehl S., Anguita J., Hoffmeyer A., Zapton T., Ihle J.N., Fikrig E. & Rincon M.** (2000). Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity.*, 13, 805-815.
- Diehl S. & Rincon M.** (2002). The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol. Immunol.*, 39, 531-536.
- Duchmann R., Kaiser I., Hermann E., Mayet W., Ewe K. & Meyer zum Buschenfelde K.H.** (1995). Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.*, 102, 448-455.
- Ehrhardt R.O., Ludviksson B.R., Gray B., Neurath M. & Strober W.** (1997). Induction and prevention of colonic inflammation in IL-2-deficient mice. *J. Immunol.*, 158, 566-573.
- Erridge C., Pridmore A., Eley A., Stewart J. & Poxton I.R.** (2004). Lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*, *Chlamydia trachomatis* and *Pseudomonas aeruginosa* signal via toll-like receptor 2. *J. Med. Microbiol.*, 53, 735-740.
- Esposito-Farese M.E., Sautes C., de la S.H., Latour S., Bieber T., de la S.C., Ohlmann P., Fridman W.H., Cazenave J.P., Teillaud J.L. & .** (1995). Membrane and soluble Fc gamma RII/III modulate the antigen-presenting capacity of murine dendritic epidermal Langerhans cells for IgG-complexed antigens. *J. Immunol.*, 155, 1725-1736.
- Everson M.P., McDuffie D.S., Lemak D.G., Koopman W.J., McGhee J.R. & Beagley K.W.** (1996). Dendritic cells from different tissues induce production of different T cell cytokine profiles. *J. Leukoc. Biol.*, 59, 494-498.
- Fagarasan S. & Honjo T.** (2000). T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science*, 290, 89-92.

- Fanger N.A., Wardwell K., Shen L., Tedder T.F. & Guyre P.M.** (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol.*, 157, 541-548.
- Fearon D.T. & Locksley R.M.** (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 272, 50-53.
- Fiocchi C.** (1998). Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*, 115, 182-205.
- Fontenot J.D., Rasmussen J.P., Gavin M.A. & Rudensky A.Y.** (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, 6, 1142-1151.
- Forster R., Schubel A., Breitfeld D., Kremmer E., Renner-Muller I., Wolf E. & Lipp M.** (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 99, 23-33.
- Fossiez F., Banchereau J., Murray R., Van K.C., Garrone P. & Lebecque S.** (1998). Interleukin-17. *Int. Rev. Immunol.*, 16, 541-551.
- Frick J.S., Zahir N., Muller M., Kahl F., Bechtold O., Lutz M.B., Kirschning C.J., Reimann J., Gilje 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, 1537-1547.
- Furtado G.C., Curotto de Lafaille M.A., Kutchukhidze N. & Lafaille J.J.** (2002). Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J. Exp. Med.*, 196, 851-857.
- Fuss I.J., Heller F., Boirivant M., Leon F., Yoshida M., Fichtner-Feigl S., Yang Z., Exley M., Kitani A., Blumberg R.S., Mannon P. & Strober W.** (2004). Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.*, 113, 1490-1497.
- Fuss I.J., Neurath M., Boirivant M., Klein J.S., de La M.C., Strong S.A., Fiocchi C. & Strober W.** (1996). Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J. Immunol.*, 157, 1261-1270.
- Geisel J.** (2006). Induktion tolerogener dendritischer Zellen: Rolle von Interleukin-6 und Maturation. Masterarbeit, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene.
- Geisel J., Kahl F., Muller M., Wagner H., Kirschning C.J., Autenrieth I.B. & Frick J.S.** (2007). IL-6 and maturation govern TLR2 and TLR4 induced TLR agonist tolerance and cross-tolerance in dendritic cells. *J. Immunol.*, 179, 5811-5818.
- Gent A.E., Hellier M.D., Grace R.H., Swarbrick E.T. & Coggon D.** (1994). Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet*, 343, 766-767.
- Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro L.A., Antignac A., Jehanno M., Viala J., Tadin K., Taha M.K., Labigne A., Zähringer U., Coyle A.J., DiStefano P.S., Bertin J., Sansonetti P.J. & Philpott D.J.** (2003). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*, 300, 1584-1587.
- Goldin B.R.** (1998). Health benefits of probiotics. *Br. J. Nutr.*, 80, S203-S207.
- Grewal I.S. & Flavell R.A.** (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 16, 111-135.
- Guarner F. & Malagelada J.R.** (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361, 512-519.
- Hampe J., Heymann K., Krawczak M. & Schreiber S.** (2003). Association of inflammatory bowel disease with indicators for childhood antigen and infection exposure. *Int. J. Colorectal Dis.*, 18, 413-417.
- Harrington L.E., Hatton R.D., Mangan P.R., Turner H., Murphy T.L., Murphy K.M. & Weaver C.T.** (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.*, 6, 1123-1132.

- Hayday A.C.** (2000). [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.*, 18, 975-1026.
- Hegde S., Pahne J. & Smola-Hess S.** (2004). Novel immunosuppressive properties of interleukin-6 in dendritic cells: inhibition of NF-kappaB binding activity and CCR7 expression. *FASEB J.*, 18, 1439-1441.
- Heil F., Hemmi H., Hochrein H., Ampenberger F., Kirschning C., Akira S., Lipford G., Wagner H. & Bauer S.** (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303, 1526-1529.
- Henri S., Vremec D., Kamath A., Waithman J., Williams S., Benoist C., Burnham K., Saeland S., Handman E. & Shortman K.** (2001). The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J. Immunol.*, 167, 741-748.
- Hill M.J.** (1997). Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur. J. Cancer Prev.*, 6 Suppl 1, S43-S45.
- Hirschfeld M., Ma Y., Weis J.H., Vogel S.N. & Weis J.J.** (2000). Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J. Immunol.*, 165, 618-622.
- Hirschfeld M., Weis J.J., Toshchakov V., Salkowski C.A., Cody M.J., Ward D.C., Qureshi N., Michalek S.M. & Vogel S.N.** (2001). Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect. Immun.*, 69, 1477-1482.
- Ho I.C. & Glimcher L.H.** (2002). Transcription: tantalizing times for T cells. *Cell*, 109 Suppl, S109-S120.
- Hoffmann J.A., Kafatos F.C., Janeway C.A. & Ezekowitz R.A.** (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284, 1313-1318.
- Huang F.P. & MacPherson G.G.** (2001). Continuing education of the immune system--dendritic cells, immune regulation and tolerance. *Curr. Mol. Med.*, 1, 457-468.
- Huber S., Schramm C., Lehr H.A., Mann A., Schmitt S., Becker C., Protschka M., Galle P.R., Neurath M.F. & Blessing M.** (2004). Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J. Immunol.*, 173, 6526-6531.
- Hulten K., El-Zimaity H.M., Karttunen T.J., Almashrawi A., Schwartz M.R., Graham D.Y. & El-Zaatari F.A.** (2001). Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Crohn's diseased tissues by in situ hybridization. *Am. J. Gastroenterol.*, 96, 1529-1535.
- Hyams J.S.** (2000). Inflammatory bowel disease. *Pediatr. Rev.*, 21, 291-295.
- Inaba K., Inaba M., Naito M. & Steinman R.M.** (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.*, 178, 479-488.
- Ingulli E., Mondino A., Khoruts A. & Jenkins M.K.** (1997). In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. *J. Exp. Med.*, 185, 2133-2141.
- Inohara N. & Nunez G.** (2003). NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 371-382.
- Israel E.J., Taylor S., Wu Z., Mizoguchi E., Blumberg R.S., Bhan A. & Simister N.E.** (1997). Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. *Immunology*, 92, 69-74.
- Ito T., Yang M., Wang Y.H., Lande R., Gregorio J., Perng O.A., Qin X.F., Liu Y.J. & Gilliet M.** (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J. Exp. Med.*, 204, 105-115.
- Itoh J., de La M.C., Strong S.A., Levine A.D. & Fiocchi C.** (2001). Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. *Gut*, 49, 35-41.

- Ivanov I.I., McKenzie B.S., Zhou L., Tadokoro C.E., Lepelley A., Lafaille J.J., Cua D.J. & Littman D.R.** (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell*, 126, 1121-1133.
- Iwasaki A.** (2007). Mucosal dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 381-418.
- Iwasaki A. & Kelsall B.L.** (1999). Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.*, 190, 229-239.
- Iwasaki A. & Kelsall B.L.** (2001). Unique functions of CD11b⁺, CD8 α ⁺, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J. Immunol.*, 166, 4884-4890.
- Janeway C.A., Traver D., Walport M. & Shlomchik M.J.** (2005). *Immunobiology*, 6th edn. Garland Science Publishing.
- Jang M.H., Sougawa N., Tanaka T., Hirata T., Hiroi T., Tohya K., Guo Z., Umemoto E., Ebisuno Y., Yang B.G., Seoh J.Y., Lipp M., Kiyono H. & Miyasaka M.** (2006). CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J. Immunol.*, 176, 803-810.
- Jiang W., Swiggard W.J., Heufler C., Peng M., Mirza A., Steinman R.M. & Nussenzweig M.C.** (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*, 375, 151-155.
- Johansson C. & Kelsall B.L.** (2005). Phenotype and function of intestinal dendritic cells. *Semin. Immunol.*, 17, 284-294.
- Johansson-Lindbom B., Svensson M., Wurbel M.A., Malissen B., Marquez G. & Agace W.** (2003). Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant. *J. Exp. Med.*, 198, 963-969.
- Kaiko G.E., Horvat J.C., Beagley K.W. & Hansbro P.M.** (2008). Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology*, 123, 326-338.
- Karlinger K., Gyorke T., Mako E., Mester A. & Tarjan Z.** (2000). The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Radiol.*, 35, 154-167.
- Karlis J., Penttila I., Tran T.B., Jones B., Nobbs S., Zola H. & Flesch I.E.** (2004). Characterization of colonic and mesenteric lymph node dendritic cell subpopulations in a murine adoptive transfer model of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel. Dis.*, 10, 834-847.
- Karsunky H., Merad M., Cozzio A., Weissman I.L. & Manz M.G.** (2003). Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3⁺ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3⁺ dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.*, 198, 305-313.
- Karsunky H., Merad M., Mende I., Manz M.G., Engleman E.G. & Weissman I.L.** (2005). Developmental origin of interferon-alpha-producing dendritic cells from hematopoietic precursors. *Exp. Hematol.*, 33, 173-181.
- Kawai T. & Akira S.** (2005). Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 17, 338-344.
- Kawamura K., Kadowaki N., Kitawaki T. & Uchiyama T.** (2006). Virus-stimulated plasmacytoid dendritic cells induce CD4⁺ cytotoxic regulatory T cells. *Blood*, 107, 1031-1038.
- Kelsall B.L. & Leon F.** (2005). Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. *Immunol. Rev.*, 206, 132-148.
- Kitamura H., Kamon H., Sawa S., Park S.J., Katunuma N., Ishihara K., Murakami M. & Hirano T.** (2005). IL-6-STAT3 controls intracellular MHC class II alphabeta dimer level through cathepsin S activity in dendritic cells. *Immunity*, 23, 491-502.

- Klebb G., Autenrieth I.B., Haber H., Gillert E., Sadlack B., Smith K.A. & Horak I.** (1996). Interleukin-2 is indispensable for development of immunological self-tolerance. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 81, 282-286.
- Kobayashi H., Miura S., Nagata H., Tsuzuki Y., Hokari R., Ogino T., Watanabe C., Azuma T. & Ishii H.** (2004). In situ demonstration of dendritic cell migration from rat intestine to mesenteric lymph nodes: relationships to maturation and role of chemokines. *J. Leukoc. Biol.*, 75, 434-442.
- Krajina T., Leithauser F., Moller P., Trobonjaca Z. & Reimann J.** (2003). Colonic lamina propria dendritic cells in mice with CD4+ T cell-induced colitis. *Eur. J. Immunol.*, 33, 1073-1083.
- Kuhn R., Lohler J., Rennick D., Rajewsky K. & Muller W.** (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75, 263-274.
- Lakatos P.L.** (2006). Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World J. Gastroenterol.*, 12, 6102-6108.
- Lanzavecchia A. & Sallusto F.** (2001). The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr. Opin. Immunol.*, 13, 291-298.
- Lenardo M.J.** (1991). Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature*, 353, 858-861.
- Lerebours E., Gower-Rousseau C., Merle V., Brazier F., Debeugny S., Marti R., Salomez J.L., Hellot M.F., Dupas J.L., Colombel J.F., Cortot A. & Benichou J.** (2007). Stressful life events as a risk factor for inflammatory bowel disease onset: A population-based case-control study. *Am. J. Gastroenterol.*, 102, 122-131.
- Lindquist R.L., Shakhar G., Dudziak D., Wardemann H., Eisenreich T., Dustin M.L. & Nussenzweig M.C.** (2004). Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat. Immunol.*, 5, 1243-1250.
- Liu Y.J.** (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 275-306.
- Loftus E.V., Jr.** (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126, 1504-1517.
- Lutz M.B., Kukutsch N., Ogilvie A.L., Rossner S., Koch F., Romani N. & Schuler G.** (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods*, 223, 77-92.
- Ma A., Datta M., Margosian E., Chen J. & Horak I.** (1995). T cells, but not B cells, are required for bowel inflammation in interleukin 2-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 182, 1567-1572.
- Macdonald T.T. & Monteleone G.** (2005). Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*, 307, 1920-1925.
- Mach N., Gillessen S., Wilson S.B., Sheehan C., Mihm M. & Dranoff G.** (2000). Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res.*, 60, 3239-3246.
- Macpherson A.J., Gatto D., Sainsbury E., Harriman G.R., Hengartner H. & Zinkernagel R.M.** (2000). A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science*, 288, 2222-2226.
- Mahler M., Bristol I.J., Leiter E.H., Workman A.E., Birkenmeier E.H., Elson C.O. & Sundberg J.P.** (1998). Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am. J. Physiol*, 274, G544-G551.

- Malek T.R., Yu A., Vincek V., Scibelli P. & Kong L.** (2002). CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity*, 17, 167-178.
- Mangan P.R., Harrington L.E., O'Quinn D.B., Helms W.S., Bullard D.C., Elson C.O., Hatton R.D., Wahl S.M., Schoeb T.R. & Weaver C.T.** (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, 441, 231-234.
- Manz M.G., Traver D., Miyamoto T., Weissman I.L. & Akashi K.** (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood*, 97, 3333-3341.
- Maraskovsky E., Brasel K., Teepe M., Roux E.R., Lyman S.D., Shortman K. & McKenna H.J.** (1996). Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.*, 184, 1953-1962.
- Maraskovsky E., Daro E., Roux E., Teepe M., Maliszewski C.R., Hoek J., Caron D., Lebsack M.E. & McKenna H.J.** (2000). In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood*, 96, 878-884.
- Mathur A.N., Chang H.C., Zisoulis D.G., Kapur R., Belladonna M.L., Kansas G.S. & Kaplan M.H.** (2006). T-bet is a critical determinant in the instability of the IL-17-secreting T-helper phenotype. *Blood*, 108, 1595-1601.
- Matsue H., Edelbaum D., Hartmann A.C., Morita A., Bergstresser P.R., Yagita H., Okumura K. & Takashima A.** (1999). Dendritic cells undergo rapid apoptosis in vitro during antigen-specific interaction with CD4+ T cells. *J. Immunol.*, 162, 5287-5298.
- Matsue H. & Takashima A.** (1999). Apoptosis in dendritic cell biology. *J. Dermatol. Sci.*, 20, 159-171.
- Matsumoto M., Funami K., Tanabe M., Oshiumi H., Shingai M., Seto Y., Yamamoto A. & Seya T.** (2003). Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.*, 171, 3154-3162.
- Matzinger P.** (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 991-1045.
- Mawdsley J.E. & Rampton D.S.** (2005). Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*, 54, 1481-1491.
- Means T.K., Lien E., Yoshimura A., Wang S., Golenbock D.T. & Fenton M.J.** (1999). The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J. Immunol.*, 163, 6748-6755.
- Medzhitov R. & Janeway C.A., Jr.** (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, 9, 4-9.
- Meijssen M.A., Brandwein S.L., Reinecker H.C., Bhan A.K. & Podolsky D.K.** (1998). Alteration of gene expression by intestinal epithelial cells precedes colitis in interleukin-2-deficient mice. *Am. J. Physiol.*, 274, G472-G479.
- Mittrucker H.W. & Kaufmann S.H.** (2004). Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited. *Eur. J. Immunol.*, 34, 306-312.
- Moll H., Fuchs H., Blank C. & Rollinghoff M.** (1993). Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur. J. Immunol.*, 23, 1595-1601.
- Mombaerts P., Mizoguchi E., Grusby M.J., Glimcher L.H., Bhan A.K. & Tonegawa S.** (1993). Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell*, 75, 274-282.
- Mora J.R., Bono M.R., Manjunath N., Weninger W., Cavanagh L.L., Roseblatt M. & von Andrian U.H.** (2003). Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature*, 424, 88-93.

- Mora J.R., Iwata M., Eksteen B., Song S.Y., Junt T., Senman B., Otipoby K.L., Yokota A., Takeuchi H., Ricciardi-Castagnoli P., Rajewsky K., Adams D.H. & von Andrian U.H.** (2006). Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science*, 314, 1157-1160.
- Moseman E.A., Liang X., Dawson A.J., Panoskaltsis-Mortari A., Krieg A.M., Liu Y.J., Blazar B.R. & Chen W.** (2004). Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.*, 173, 4433-4442.
- Mowat A.M.** (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 331-341.
- Murphy K.M., Ouyang W., Farrar J.D., Yang J., Ranganath S., Asnagli H., Afkarian M. & Murphy T.L.** (2000). Signaling and transcription in T helper development. *Annu. Rev. Immunol.*, 18, 451-494.
- Naik S.H., Metcalf D., van N.A., Wicks I., Wu L., O'Keeffe M. & Shortman K.** (2006). Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat. Immunol.*, 7, 663-671.
- Nair B.C., Mayberry W.R., Dziak R., Chen P.B., Levine M.J. & Hausmann E.** (1983). Biological effects of a purified lipopolysaccharide from *Bacteroides gingivalis*. *J. Periodontal Res.*, 18, 40-49.
- Naito Y., Takagi T., Uchiyama K., Kuroda M., Kokura S., Ichikawa H., Yanagisawa R., Inoue K., Takano H., Satoh M., Yoshida N., Okanoue T. & Yoshikawa T.** (2004). Reduced intestinal inflammation induced by dextran sodium sulfate in interleukin-6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.*, 14, 191-196.
- Nakamura K., Funakoshi H., Miyamoto K., Tokunaga F. & Nakamura T.** (2001). Molecular cloning and functional characterization of a human scavenger receptor with C-type lectin (SRCL), a novel member of a scavenger receptor family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280, 1028-1035.
- Neurath M.F., Finotto S. & Glimcher L.H.** (2002). The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat. Med.*, 8, 567-573.
- Neurath M.F., Fuss I., Kelsall B.L., Stuber E. & Strober W.** (1995). Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J. Exp. Med.*, 182, 1281-1290.
- Newman B. & Siminovitch K.A.** (2005). Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 21, 401-407.
- Niess J.H., Brand S., Gu X., Landsman L., Jung S., McCormick B.A., Vyas J.M., Boes M., Ploegh H.L., Fox J.G., Littman D.R. & Reinecker H.C.** (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, 307, 254-258.
- O'Keeffe M., Hochrein H., Vremec D., Caminschi I., Miller J.L., Anders E.M., Wu L., Lahoud M.H., Henri S., Scott B., Hertzog P., Tatarczuch L. & Shortman K.** (2002). Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J. Exp. Med.*, 196, 1307-1319.
- Onderdonk A.B., Bronson R. & Cisneros R.** (1987). Comparison of *Bacteroides vulgatus* strains in the enhancement of experimental ulcerative colitis. *Infect. Immun.*, 55, 835-836.
- Orholm M., Munkholm P., Langholz E., Nielsen O.H., Sorensen T.I. & Binder V.** (1991). Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.*, 324, 84-88.
- Park H., Li Z., Yang X.O., Chang S.H., Nurieva R., Wang Y.H., Wang Y., Hood L., Zhu Z., Tian Q. & Dong C.** (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.*, 6, 1133-1141.
- Park S.J., Nakagawa T., Kitamura H., Atsumi T., Kamon H., Sawa S., Kamimura D., Ueda N., Iwakura Y., Ishihara K., Murakami M. & Hirano T.** (2004). IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J. Immunol.*, 173, 3844-3854.

- Perl D.P., Fogarty U., Harpaz N. & Sachar D.B.** (2004). Bacterial-metal interactions: the potential role of aluminum and other trace elements in the etiology of Crohn's disease. *Inflamm. Bowel. Dis.*, 10, 881-883.
- Philpott D.J. & Girardin S.E.** (2004). The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol. Immunol.*, 41, 1099-1108.
- Platt N., da Silva R.P. & Gordon S.** (1998). Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells. *Biochem. Soc. Trans.*, 26, 639-644.
- Platt N. & Gordon S.** (1998). Scavenger receptors: diverse activities and promiscuous binding of polyanionic ligands. *Chem. Biol.*, 5, R193-R203.
- Podolsky D.K.** (1991). Inflammatory bowel disease (2). *N. Engl. J. Med.*, 325, 1008-1016.
- Powell B.R., Buist N.R. & Stenzel P.** (1982). An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J. Pediatr.*, 100, 731-737.
- Powrie F., Leach M.W., Mauze S., Caddle L.B. & Coffman R.L.** (1993). Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int. Immunol.*, 5, 1461-1471.
- Pulendran B., Lingappa J., Kennedy M.K., Smith J., Teepe M., Rudensky A., Maliszewski C.R. & Maraskovsky E.** (1997). Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J. Immunol.*, 159, 2222-2231.
- Pulendran B., Palucka K. & Banchereau J.** (2001). Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science*, 293, 253-256.
- Rakoff-Nahoum S., Hao L. & Medzhitov R.** (2006). Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity.*, 25, 319-329.
- Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F., Edberg S. & Medzhitov R.** (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118, 229-241.
- Ramsdell F.** (2003). Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity.*, 19, 165-168.
- Rath H.C., Wilson K.H. & Sartor R.B.** (1999). Differential induction of colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats selectively colonized with *Bacteroides vulgatus* or *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 67, 2969-2974.
- Re F. & Strominger J.L.** (2001). Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J. Biol. Chem.*, 276, 37692-37699.
- Re F. & Strominger J.L.** (2004). IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J. Immunol.*, 173, 7548-7555.
- Regnault A., Lankar D., Lacabanne V., Rodriguez A., Thery C., Rescigno M., Saito T., Verbeek S., Bonnerot C., Ricciardi-Castagnoli P. & Amigorena S.** (1999). Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.*, 189, 371-380.
- Reis e Sousa** (2001). Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity.*, 14, 495-498.
- Reis e Sousa & Austyn J.M.** (1993). Phagocytosis of antigens by Langerhans cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 329, 199-204.
- Rescigno M. & Chieppa M.** (2005). Gut-level decisions in peace and war. *Nat. Med.*, 11, 254-255.

- Rescigno M., Urbano M., Valzasina B., Francolini M., Rotta G., Bonasio R., Granucci F., Kraehenbuhl J.P. & Ricciardi-Castagnoli P.** (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.*, 2, 361-367.
- Rhee K.J., Sethupathi P., Driks A., Lanning D.K. & Knight K.L.** (2004). Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire. *J. Immunol.*, 172, 1118-1124.
- Ridge J.P., Di R.F. & Matzinger P.** (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature*, 393, 474-478.
- Rimoldi M., Chieppa M., Salucci V., Avogadri F., Sonzogni A., Sampietro G.M., Nespoli A., Viale G., Allavena P. & Rescigno M.** (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat. Immunol.*, 6, 507-514.
- Rudolph U., Finegold M.J., Rich S.S., Harriman G.R., Srinivasan Y., Brabet P., Bradley A. & Birnbaumer L.** (1995). Gi2 alpha protein deficiency: a model of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Immunol.*, 15, 101S-105S.
- Sadlack B., Lohler J., Schorle H., Klebb G., Haber H., Sickel E., Noelle R.J. & Horak I.** (1995). Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.*, 25, 3053-3059.
- Sadlack B., Merz H., Schorle H., Schimpl A., Feller A.C. & Horak I.** (1993). Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*, 75, 253-261.
- Sakaguchi S.** (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.*, 6, 345-352.
- Sallusto F., Cella M., Danieli C. & Lanzavecchia A.** (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.*, 182, 389-400.
- Sallusto F. & Lanzavecchia A.** (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.*, 179, 1109-1118.
- Sallusto F., Schaerli P., Loetscher P., Schaniel C., Lenig D., Mackay C.R., Qin S. & Lanzavecchia A.** (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.*, 28, 2760-2769.
- Sartor R.B.** (2004a). Microbial influences in inflammatory bowel disease: role in pathogenesis and clinical implications. In: *Kirsner's Inflammatory Bowel Diseases* (eds. Sartor R.B. & Sandborn W.J.). Saunders, pp. 138-162.
- Sartor R.B.** (2004b). Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology*, 126, 1620-1633.
- Sartor R.B.** (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, 3, 390-407.
- Sato A., Hashiguchi M., Toda E., Iwasaki A., Hachimura S. & Kaminogawa S.** (2003). CD11b+ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. *J. Immunol.*, 171, 3684-3690.
- Sato A. & Iwasaki A.** (2004). Induction of antiviral immunity requires Toll-like receptor signaling in both stromal and dendritic cell compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, 16274-16279.
- Schorle H., Holtshcke T., Hunig T., Schimpl A. & Horak I.** (1991). Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature*, 352, 621-624.

- Schramm C., Huber S., Protschka M., Czochra P., Burg J., Schmitt E., Lohse A.W., Galle P.R. & Blessing M.** (2004). TGFbeta regulates the CD4+CD25+ T-cell pool and the expression of Foxp3 in vivo. *Int. Immunol.*, 16, 1241-1249.
- Schultz M., Tonkonogy S.L., Sellon R.K., Veltkamp C., Godfrey V.L., Kwon J., Grenther W.B., Balish E., Horak I. & Sartor R.B.** (1999). IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am. J. Physiol.*, 276, G1461-G1472.
- Schwartz R.H.** (2005). Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat. Immunol.*, 6, 327-330.
- Sears C.L.** (2005). A dynamic partnership: celebrating our gut flora. *Anaerobe.*, 11, 247-251.
- Setoguchi R., Hori S., Takahashi T. & Sakaguchi S.** (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.*, 201, 723-735.
- Shevach E.M.** (2002). CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.*, 2, 389-400.
- Shigematsu H., Reizis B., Iwasaki H., Mizuno S., Hu D., Traver D., Leder P., Sakaguchi N. & Akashi K.** (2004). Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity.*, 21, 43-53.
- Shikina T., Hiroi T., Iwatani K., Jang M.H., Fukuyama S., Tamura M., Kubo T., Ishikawa H. & Kiyono H.** (2004). IgA class switch occurs in the organized nasopharynx- and gut-associated lymphoid tissue, but not in the diffuse lamina propria of airways and gut. *J. Immunol.*, 172, 6259-6264.
- Shortman K. & Liu Y.J.** (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.*, 2, 151-161.
- Shortman K. & Naik S.H.** (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.*, 7, 19-30.
- Shurin M.R., Pandharipande P.P., Zorina T.D., Haluszczak C., Subbotin V.M., Hunter O., Brumfield A., Storkus W.J., Maraskovsky E. & Lotze M.T.** (1997). FLT3 ligand induces the generation of functionally active dendritic cells in mice. *Cell Immunol.*, 179, 174-184.
- Simpson S.J., Mizoguchi E., Allen D., Bhan A.K. & Terhorst C.** (1995). Evidence that CD4+, but not CD8+ T cells are responsible for murine interleukin-2-deficient colitis. *Eur. J. Immunol.*, 25, 2618-2625.
- Stagg A.J., Kamm M.A. & Knight S.C.** (2002). Intestinal dendritic cells increase T cell expression of alpha4beta7 integrin. *Eur. J. Immunol.*, 32, 1445-1454.
- Steinhoff U.** (2005). Who controls the crowd? New findings and old questions about the intestinal microflora. *Immunol. Lett.*, 99, 12-16.
- Steinman R.M., Hawiger D. & Nussenzweig M.C.** (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 21, 685-711.
- Steinman R.M. & Nussenzweig M.C.** (2002). Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99, 351-358.
- Stockinger B. & Veldhoen M.** (2007). Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 19, 281-286.
- Strober W., Fuss I. & Mannon P.** (2007). The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.*, 117, 514-521.
- Strober W., Fuss I.J. & Blumberg R.S.** (2002). The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.*, 20, 495-549.

- Sundberg J.P., Elson C.O., Bedigian H. & Birkenmeier E.H.** (1994). Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology*, 107, 1726-1735.
- Swidsinski A., Ladhoff A., Pernthaler A., Swidsinski S., Loening-Baucke V., Ortner M., Weber J., Hoffmann U., Schreiber S., Dietel M. & Lochs H.** (2002). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 122, 44-54.
- Takeda K., Kaisho T. & Akira S.** (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 21, 335-376.
- Takenaka S., Safroneeva E., Xing Z. & Gauldie J.** (2007). Dendritic cells derived from murine colonic mucosa have unique functional and phenotypic characteristics. *J. Immunol.*, 178, 7984-7993.
- Thery C. & Amigorena S.** (2001). The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 13, 45-51.
- Traver D., Akashi K., Manz M., Merad M., Miyamoto T., Engleman E.G. & Weissman I.L.** (2000). Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science*, 290, 2152-2154.
- Tysk C., Lindberg E., Jarnerot G. & Floderus-Myrhed B.** (1988). Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut*, 29, 990-996.
- Van P.L., Refaeli Y., Lord J.D., Nelson B.H., Abbas A.K. & Baltimore D.** (1999). Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity.*, 11, 281-288.
- Veldhoen M., Hocking R.J., Atkins C.J., Locksley R.M. & Stockinger B.** (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.*, 24, 179-189.
- Viney J.L., Mowat A.M., O'Malley J.M., Williamson E. & Fanger N.A.** (1998). Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J. Immunol.*, 160, 5815-5825.
- von B.H.** (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.*, 6, 338-344.
- Waidmann M., Allemand Y., Lehmann J., di G.S., Bucheler N., Hamann A. & Autenrieth I.B.** (2002). Microflora reactive IL-10 producing regulatory T cells are present in the colon of IL-2 deficient mice but lack efficacious inhibition of IFN-gamma and TNF-alpha production. *Gut*, 50, 170-179.
- 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, 162-177.
- Waldmann T.A.** (2006). The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.*, 6, 595-601.
- Walton K.L., He J., Kelsall B.L., Sartor R.B. & Fisher N.C.** (2006). Dendritic cells in germ-free and specific pathogen-free mice have similar phenotypes and in vitro antigen presenting function. *Immunol. Lett.*, 102, 16-24.
- Weaver C.T., Harrington L.E., Mangan P.R., Gavrieli M. & Murphy K.M.** (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.*, 24, 677-688.
- 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, 18129-18134.

- West M.A., Wallin R.P., Matthews S.P., Svensson H.G., Zaru R., Ljunggren H.G., Prescott A.R. & Watts C.** (2004). Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science*, 305, 1153-1157.
- Wilson N.S., El-Sukkari D., Belz G.T., Smith C.M., Steptoe R.J., Heath W.R., Shortman K. & Villadangos J.A.** (2003). Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood*, 102, 2187-2194.
- Wirtz S., Finotto S., Kanzler S., Lohse A.W., Blessing M., Lehr H.A., Galle P.R. & Neurath M.F.** (1999). Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN-gamma-producing CD4+ T cells that respond to bacterial antigens. *J. Immunol.*, 162, 1884-1888.
- Wolf M., Schimpl A. & Hunig T.** (2001). Control of T cell hyperactivation in IL-2-deficient mice by CD4(+)/CD25(-) and CD4(+)/CD25(+) T cells: evidence for two distinct regulatory mechanisms. *Eur. J. Immunol.*, 31, 1637-1645.
- Wu L., Vandenabeele S. & Georgopoulos K.** (2001). Derivation of dendritic cells from myeloid and lymphoid precursors. *Int. Rev. Immunol.*, 20, 117-135.
- Xavier R.J. & Podolsky D.K.** (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448, 427-434.
- Yamamoto M., Yoshizaki K., Kishimoto T. & Ito H.** (2000). IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J. Immunol.*, 164, 4878-4882.
- Yanagihara S., Komura E., Nagafune J., Watarai H. & Yamaguchi Y.** (1998). EB1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J. Immunol.*, 161, 3096-3102.
- Yoneyama H., Matsuno K., Zhang Y., Nishiwaki T., Kitabatake M., Ueha S., Narumi S., Morikawa S., Ezaki T., Lu B., Gerard C., Ishikawa S. & Matsushima K.** (2004). Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int. Immunol.*, 16, 915-928.
- Zheng Y. & Rudensky A.Y.** (2007). Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat. Immunol.*, 8, 457-462.
- Zoetendal E.G., Akkermans A.D. & De Vos W.M.** (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3854-3859.

9 Danksagung

Bei Frau Dr. Julia-Stefanie Frick möchte ich mich herzlich für die hervorragende Betreuung und Unterstützung, für ihr Engagement, ihre Geduld und für ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion bedanken.

Herrn Prof. Dr. Ingo Autenrieth danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut sowie für seine Anregungen zu dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Friedrich Götz bedanke ich mich für die Begutachtung meiner Arbeit und die Vertretung meiner Dissertation an der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen.

Für die Kooperationsbereitschaft mit der Universität Ulm möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jörg Reimann und besonders bei Frau Sabine Schmidt bedanken.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Arbeitsgruppe (Jule, Kerstin, Frauke, Katrin und Andi) für die angenehme Zusammenarbeit, das hervorragende Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft.

Mein herzlicher Dank gilt Tamara, Moni, Naima, Isabell und Juliane die mich während meiner Arbeit methodisch unterstützten, mich in technische Bereiche einführten und auf viele Fragen einen Rat wussten. Allen anderen Mitgliedern des Instituts für medizinische Mikrobiologie ein herzliches Danke für die schöne Zeit.

Weiterhin möchte ich mich ganz besonders bei allen Mitarbeitern bedanken, mit denen ich meinen Kaffee getrunken, Fußball oder Badminton gespielt, mit denen ich Pflanzen gezüchtet oder im Staffellauf mitgerannt bin und mit denen ich auch außerhalb des Instituts viel unternommen habe. Im Besonderen denke ich an Miri, Chrischie, Irena, Diana, Yvi, Hanna, Patrick W., Ulli, Gianluca und Martin.

Von ganzem Herzen danke ich Steffen und meiner Familie, die mich während meiner Promotion liebevoll unterstützt haben.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Martina Müller

geboren am 20.06.1979 in Karlsruhe

Schulbildung

1989 - 1995 Realschule in Karlsbad Langensteinbach: Realschulabschluss

1995 - 1998 Ernährungswissenschaftliches Gymnasium in Karlsruhe:

Allgemeine Hochschulreife

Auslandsaufenthalt

1998 – 1999 Au-pair in England / London

Hochschulstudium

1999 - 2004 Lebensmittelchemie-Studium an der Universität Karlsruhe (TH)

Prüfungsfächer: Allgemeine Lebensmittelchemie, Biochemie, Toxikologie,
Lebensmittelverfahrenstechnik und Mikrobiologie.

2004 Diplomarbeit: Einfluss von Selenverbindungen auf die Nukleotidexzisions-
reparatur in menschlichen Zellen, Prof. Dr. A. Hartwig.

Promotion

2004 – 2008: Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Klinikum der Eberhard
Karls Universität Tübingen, Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth; betreut durch Frau
Dr. Julia-Stefanie Frick.

Thema: Differentielle Modulation dendritischer Zellen durch kommensale
Bakterien in IL-2-defizienten Mäusen.

11 Publikationen

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, 1537-1547.

Geisel J., Kahl F., Muller M., Wagner H., Kirschning C.J., Autenrieth I.B. & Frick J.S. (2007). IL-6 and maturation govern TLR2 and TLR4 induced TLR agonist tolerance and cross-tolerance in dendritic cells. *J. Immunol.*, 179, 5811-5818.

Muller M, Fink K., Geisel J., Kahl F., Jilge B., Reimann J., Mach N., Autenrieth I. B. & Julia S. Frick. Intestinal colonization of IL-2 deficient mice with non-colitogenic *B. vulgatus* prevents DC maturation and T-cell polarization. *Submitted.*

Poster und Vorträge

2. gemeinsamer Kongress der DGHM und VAAM, Göttingen, 25.-28.09.2005; Poster: Identification of commensal bacteria strains modulating intestinal immune responses.

58. Jahrestagung der DGHM, Würzburg, 01.-04.10.2006; Poster: Differential modulation of intestinal dendritic cells by colitogenic or protective commensal bacteria.

5th Meeting of the European Mucosal Immunology Group; Prag, 05.-07.10.2006, EFIS travel grant; Poster: Differential modulation of intestinal dendritic cells by colitogenic or protective commensal bacteria.

11. Minisymposium „Infektion und Immunabwehr“, Burg Rothenfels, 9.–11. März 2007: Vortrag: Differential dendritic cell modulation by commensal bacteria *in vivo*.