

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der  
Universität Tübingen

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

***In vitro*-Analyse des Einflusses intestinaler Kommensalen  
auf die  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und MCP1-Expression in dendritischen Zellen  
und die damit assoziierte T-Zell-Antwort**

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

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

**vorgelegt von**

**Treß, Marcel**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. J.-S. Frick

2. Berichterstatter: Professor Dr. C.-T. Bock

Tag der Disputation: 01.12.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die intestinale Mikrobiota.....	1
1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen .....	3
1.3 Das intestinale Immunsystem .....	7
1.4 Die Proteine MCP1P1 und I $\kappa$ B $\zeta$ .....	11
1.5 Wissenschaftliche Fragestellungen .....	15
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
2.1 Material.....	17
2.1.1 Mäuse.....	17
2.1.2 Bakterien .....	17
2.1.3 Zelllinien .....	17
2.1.4 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien .....	18
2.1.5 Puffer und Medien (eigene Herstellung) .....	20
2.1.6 Kits .....	21
2.1.7 Antikörper .....	22
2.1.8 Primer.....	23
2.1.9 Software .....	23
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Kultivierung der Bakterien .....	24
2.2.2 Gewinnung der Mikrobiota-Suspensionen.....	24
2.2.3 Gewinnung der Überstände-Pools.....	25
2.2.4 Zellkultur mit murinen dendritischen Zellen .....	26
2.2.5 Zellkultur mit murinen intestinalen Epithelzellen.....	31
2.2.6 T-Zell-Polarisations-Assay .....	33
2.2.7 Analyse der zellulären Protein-Expression (FACS) .....	36
2.2.8 Analyse der zellulären Gen-Expression (qPCR).....	41
2.2.9 Analyse der zellulären Zytokin-Expression (ELISA) .....	44

2.2.10	Statistische Auswertung .....	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
3.1	Expression von I $\kappa$ B $\zeta$ und MCP1P1 in dendritischen Zellen .....	45
3.1.1	I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCP1P1-Expression in BMDCs nach Stimulation mit <i>B. vulgatus</i> mpk und <i>E. coli</i> mpk.....	45
3.1.2	Zytokin-Sekretion von BMDCs nach Stimulation mit <i>B. vulgatus</i> mpk und <i>E. coli</i> mpk.....	48
3.1.3	I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCP1P1-Expression in BMDCs nach Stimulation mit murinen Mikrobiota-Suspensionen .....	49
3.1.4	Zytokin-Sekretion von BMDCs nach Stimulation mit murinen Mikrobiota-Suspensionen .....	52
3.1.5	TLR-abhängige Expression von I $\kappa$ B $\zeta$ und MCP1P1 in BMDCs nach Stimulation mit <i>B. vulgatus</i> mpk und <i>E. coli</i> mpk .....	53
3.1.6	TLR-abhängige Maturation von BMDCs nach Stimulation mit <i>B. vulgatus</i> mpk und <i>E. coli</i> mpk.....	57
3.1.7	Einfluss von DC-Zytokinen auf I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCP1P1- Expression in nicht bakteriell stimulierten BMDCs .....	58
3.2	Einfluss von DC-Zytokinen auf Überleben und Differenzierung naiver T-Zellen.....	63
3.3	Expression von I $\kappa$ B $\zeta$ und MCP1P1 in intestinalen Epithelzellen.....	68
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>72</b>
4.1	I $\kappa$ B $\zeta$ und MCP1P1 in dendritischen Zellen.....	72
4.2	Einfluss kommensal induzierter DC-Zytokine auf die T-Zell- Differenzierung .....	82
4.3	I $\kappa$ B $\zeta$ und MCP1P1 in intestinalen Epithelzellen .....	87
4.4	Schlussfolgerungen .....	91
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>111</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>112</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Gating von BMDCs.....	39
Abb. 2:	Gating zur Ermittlung des Anteils lebender T-Zellen .....	39
Abb. 3:	Gating zur Analyse der T <sub>H</sub> -Subgruppen I .....	40
Abb. 4:	Gating zur Analyse der T <sub>H</sub> -Subgruppen II .....	40
Abb. 5:	Gating von mIC <sub>cl2</sub> -Zellen.....	41
Abb. 6:	I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCPIP1-Expression in BMDCs nach Stimulation mit kommensalen Bakterienstämmen .....	47
Abb. 7:	Zytokin-Sekretion von BMDCs nach Stimulation mit kommensalen Bakterienstämmen.....	49
Abb. 8:	I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCPIP1-Expression in BMDCs nach Stimulation mit murinen Mikrobiota-Suspensionen .....	51
Abb. 9:	Zytokin-Sekretion von BMDCs nach Stimulation mit murinen Mikrobiota-Suspensionen .....	53
Abb. 10:	TLR-abhängige Expression von I $\kappa$ B $\zeta$ und MCPIP1 in bakteriell stimulierten BMDCs.....	56
Abb. 11:	TLR-abhängige Maturation bakteriell stimulierter BMDCs.....	58
Abb. 12:	I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCPIP1-Expression in BMDCs nach Stimulation mit BMDC-Überständen .....	60
Abb. 13:	Maturation von BMDCs nach Stimulation mit BMDC-Überständen .	62
Abb. 14:	Überleben von T-Zellen nach Stimulation mit BMDC-Überständen.	64
Abb. 15:	Polarisation naiver T-Zellen mit BMDC-Überständen .....	67
Abb. 16:	I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCPIP1-Expression in mIC <sub>cl2</sub> -Zellen nach Stimulation mit kommensalen Bakterienstämmen .....	70

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Geräte .....	18
Tab. 2:	Verbrauchsmaterialien.....	18
Tab. 3:	Chemikalien.....	19
Tab. 4:	Puffer und Medien (eigene Herstellung) .....	20
Tab. 5:	Kits .....	21
Tab. 6:	FACS-Antikörper .....	22
Tab. 7:	Sonstige Antikörper .....	22
Tab. 8:	Primer.....	23
Tab. 9:	Software .....	23
Tab. 10:	Reaktionsprogramm der quantitativen Real Time-PCR (qPCR) .....	43

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zelle
BHI-Medium	<i>Brain Heart Infusion-Medium</i>
BMDC	<i>Bone marrow derived dendritic cell</i>
BV	<i>Bacteroides vulgatus</i> mpk
CD	<i>Crohn's disease</i> (Morbus Crohn)
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
DC	Dendritische Zelle
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DPBS/FCS	DPBS mit 1 % FCS
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DSS	Dextran-Natriumsulfat
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EC	<i>Escherichia coli</i> mpk
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ELP	Erythrozyten-Lyse-Puffer
FACS	<i>Fluorescence-activated cell scanning</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	Fetales Kälberserum
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FVD	<i>Fixable Viability Dye</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B</i>
I $\kappa$ B $\zeta$	NF- $\kappa$ B-Inhibitor zeta
IBD	<i>Inflammatory bowel disease</i> (siehe CED)
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
LB-Medium	<i>Luria-Bertani-Medium</i>
LPS	Lipopolysaccharid

MALT1	<i>Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1</i>
MAMP	<i>Microbe associated molecular pattern</i>
MCP1P1	<i>Monocyte chemotactic protein-induced protein 1</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
ns	Nicht signifikant
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte, gemessen bei Wellenlänge 600 nm
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PBS/FCS	PBS mit 1 % FCS
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
qPCR	Siehe RT-PCR
rIL-6	Rekombinantes IL-6
RLT	RLT-Puffer ( <i>RNeasy-Kit, Qiagen</i> )
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
SFB	<i>Segmented filamentous bacteria</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
TC	T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle
UC	<i>Ulcerative Colitis</i> (Colitis ulcerosa)
ÜS	Überstand
WT	Wildtyp
$\alpha$ IL-6	Anti-IL-6-Antikörper

# 1 Einleitung

## 1.1 Die intestinale Mikrobiota

Während lange Zeit in der Fachliteratur davon ausgegangen wurde, dass die Zahl humaner Zellen von der Anzahl an den menschlichen Körper besiedelnden bakteriellen Zellen um das Zehnfache übertroffen wird, legen neuere Berechnungen nahe, dass lediglich ca. 1,3 Bakterien auf jede menschliche Zelle kommen (Sender et al., 2016). Auch wenn der menschliche Organismus damit zahlenmäßig nicht in einem so großen Ausmaß wie früher angenommen von den mit ihm lebenden Mikroorganismen überragt wird, wirken sich diese doch in teils erheblichem Ausmaß auf die Funktionen des Körpers aus. In diesem Zusammenhang wird die Gesamtheit der Mikroorganismen, die in oder auf dem Menschen leben, als Mikrobiota bezeichnet, während die Gesamtheit der Genome dieser Mikroorganismen das Mikrobiom darstellt (Turnbaugh et al., 2007).

Den mit Abstand überwiegenden Anteil an der humanen Mikrobiota stellen Bakterien, wovon mit geschätzt  $3,9 \cdot 10^{13}$  Bakterien die größte Anzahl im Colon zu finden ist (Sender et al., 2016). Die intestinale Mikrobiota eines Individuums setzt sich dabei geschätzt aus mindestens 160 verschiedenen bakteriellen Spezies zusammen (Qin et al., 2010), wobei die Angaben in der Literatur hierzu teils uneinheitlich sind. Die genaue Zusammensetzung ist individuell, wobei innerhalb einer Familie gewisse Ähnlichkeiten, auch bei räumlicher Trennung der Familienmitglieder, beobachtet werden können (Turnbaugh et al., 2009). Dabei machen Spezies aus den Stämmen der *Bacteroidetes* und *Firmicutes* den Großteil der bakteriellen Mikrobiota aus (Eckburg et al., 2005; Turnbaugh et al., 2007; Pickard et al., 2017), während nur wenige Spezies beispielsweise aus den Stämmen der *Actinobacteria*, *Fusobacteria* oder *Proteobacteria*, zu denen auch *Escherichia coli* zählt, nachweisbar sind (Eckburg et al., 2005).

Generell müssen innerhalb der intestinalen Bakterien Pathobionten, die prinzipiell als unschädliche Kommensale leben und nur unter bestimmten Bedingungen wie veränderten Umwelteinflüssen oder empfänglicher Genetik des

Wirts Entzündungsreaktionen oder Krankheit auslösen, von Pathogenen, die nur selten in Kontakt mit dem Wirtsorganismus stehen und bei Infektion zu Krankheit führen können, unterschieden werden (Round & Mazmanian, 2009; Caruso et al., 2020). Kommensale Mikroorganismen profitieren von der Beziehung zum Wirt, ohne diesem explizit zu nützen (Round & Mazmanian, 2009). Im Rahmen einer Symbiose können Bestandteile der intestinalen Mikrobiota für ihren Wirt in vielerlei Hinsicht eine wichtige Rolle spielen. So bietet die intestinale Flora ihrem Wirt beispielsweise metabolische Vorteile im Rahmen der Nahrungsverwertung oder schützt ihn vor pathogener Besiedlung im Sinne einer Kolonisierungsresistenz (Pickard et al., 2017). Auch ist die intestinale Mikrobiota essentiell für die Ausbildung einer adäquaten intestinalen Barriere im Colon und damit wichtig für die Aufrechterhaltung einer Homöostase zwischen Mikroorganismen und Mensch im Gastrointestinaltrakt (Hayes et al., 2018). Auch für die adäquate Entwicklung und Funktion des Immunsystems spielt die intestinale Mikrobiota eine entscheidende Rolle und könnte ebenso in der Evolution des adaptiven Immunsystems maßgeblich beteiligt gewesen sein (El Aidy et al., 2012; Lee & Mazmanian, 2010).

Mit Blick auf die wichtigen Funktionen, die die intestinale Flora für ihren Wirt übernimmt, scheint es nicht zu überraschen, dass diverse Erkrankungen mit Veränderungen der intestinalen Mikrobiota, einer sogenannten Dysbiose (Ni et al., 2017), assoziiert sind. So wurden beispielsweise metabolische Störungen wie Diabetes mellitus Typ 1 (Murri et al., 2013) und Typ 2 (Larsen et al., 2010) oder Adipositas (Ridaura et al., 2013) mit intestinaler Dysbiose in Verbindung gebracht. Sogar bei psychischen Störungen wie Depression (Jiang et al., 2015) oder Autismus-Spektrum-Störungen (Adams et al., 2011) konnten Abweichungen der intestinalen Mikrobiota der Patienten festgestellt werden. Interessanterweise ist für letztere die Möglichkeit beschrieben, im Mausmodell durch Gabe des Symbionten *Bacteroides fragilis* bzw. bei pädiatrischen Autismus-Patienten im Rahmen einer Stuhltransplantation die intestinale Mikroflora positiv zu beeinflussen und so eine Reduktion der Autismus-Symptomatik erreichen zu können (Hsiao et al., 2013; Kang et al., 2017). Auch der therapeutische Erfolg der Stuhltransplantation bei rezidivierender *Clostridioides difficile*-Infektion (van

Nood et al., 2013) zeigt, dass sich bestimmte Erkrankungen durch aktive, günstige Veränderung der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota positiv beeinflussen lassen. Dies kann zwar für eine kausale Beziehung zwischen Erkrankungen und intestinaler Dysbiose sprechen, in den genannten Beispielen war eine Kausalität jedoch meist nicht abschließend bewiesen.

## 1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Unter dem Sammelbegriff der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED, engl.: *inflammatory bowel disease* (IBD)) werden die beiden Krankheitsbilder Morbus Crohn (*Crohn's disease* (CD)) und Colitis ulcerosa (*Ulcerative colitis* (UC)) zusammengefasst. Beide Erkrankungen sind gekennzeichnet durch chronische, schubförmig verlaufende Entzündungen im Bereich des Gastrointestinaltraktes, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich klinischer Symptomatik und Lokalisation der Entzündung.

Die inflammatorischen Prozesse sind bei Colitis ulcerosa meist auf das Colon beschränkt, bei wenigen Patienten kann auch das terminale Ileum betroffen sein (Backwash-Ileitis). Typischerweise beginnt die Entzündung im Rektum und kann sich von dort kontinuierlich bis über das gesamte Colon ausbreiten. Im Gegensatz zu Morbus Crohn sind bei Colitis ulcerosa nicht alle Wandschichten des Darms von der Entzündung betroffen. Klinisch präsentieren sich UC-Patienten in Abhängigkeit von der Ausbreitung der Erkrankung mit blutiger Diarrhoe, erhöhter Stuhlfrequenz oder abdominellen Schmerzen. Bei schwererem Verlauf können auch Fieber, Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust oder eine Anämie vorliegen. Ziel der Therapie der Colitis ulcerosa ist die Induktion und Aufrechterhaltung von Remission zur Vermeidung von Komplikationen oder chirurgischen Interventionen. Dies erfolgt in erster Linie medikamentös durch stadiengerechte immunsuppressive Therapie mittels 5-Aminosalicylsäure-Derivaten, Corticosteroiden oder Biologika wie Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ -Inhibitoren oder Integrin-Blockern. Ineffektivität der medikamentösen Therapie oder schwere Verläufe können auch eine chirurgische

Therapie bis hin zur Kolektomie notwendig machen. (Baumgart & Sandborn, 2007; Ungaro et al., 2017)

Im Gegensatz zur Colitis ulcerosa können bei Morbus Crohn alle Abschnitte des Gastrointestinaltrakts, von oral bis anal, betroffen sein. Die Inflammation stellt sich hierbei als transmurale Entzündung aller Wandschichten dar, wobei inflammatorische Herde typischerweise diskontinuierlich angeordnet sind. Die klinische Symptomatik der Patienten ist stark abhängig von der Entzündungslokalisation. Charakteristische Symptome sind abdominelle Schmerzen mit chronischer Diarrhoe und Gewichtsverlust. Da es bei Progression der Erkrankung zur Bildung intestinaler Stenosen, Fisteln oder Abszesse kommen kann, können auch damit assoziierte Symptome wie Fieber oder eine gestörte Darmpassage auftreten und chirurgische Interventionen notwendig werden. Zunächst erfolgt die Therapie jedoch medikamentös mit dem Ziel, eine Progression der Erkrankung zu verhindern. Dabei kommen stadienabhängig neben Corticosteroiden und Immunsuppressiva (z.B. Azathioprin, Methotrexat) auch Integrin-Blocker oder TNF- $\alpha$ -Inhibitoren als Biologika zur Anwendung. Sowohl bei Morbus Crohn als auch Colitis ulcerosa zeigen sich bei einem Teil der Patienten extraintestinale Manifestationen der Erkrankungen (z.B. Uveitis, Arthritis, Myokarditis). (Baumgart & Sandborn, 2007; Torres et al., 2017)

Die beschriebene Symptomatik kann sich deutlich auf das Leben von CED-Patienten auswirken. So litten in Untersuchungen von CED-Patienten in Deutschland 15 % an depressiven Symptomen, 21 % waren in ihrer Sexualität beeinträchtigt (Bokemeyer et al., 2013). Sowohl die mentale als auch die physische Lebensqualität scheint in CED-Patienten im Vergleich zu Gesunden verringert zu sein (Knowles et al., 2018a). Hier scheint die Lebensqualität vor allem in aktiven Erkrankungsphasen eingeschränkt zu sein und könnte bei Morbus Crohn stärker beeinträchtigt sein als bei Colitis ulcerosa (Knowles et al., 2018b). Auch besteht vor allem bei schwer betroffenen CED-Patienten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms und daran zu versterben (Beaugerie et al., 2013; Olén et al., 2020). Unglücklicherweise wird trotz ausgeprägtem Einsatz immunsuppressiver Therapie in Deutschland von einem Drittel an CED-Patienten berichtet, die sich nicht in Remission befinden

(Bokemeyer et al., 2013), sodass verbesserte Therapiemöglichkeiten für diese Krankheiten wünschenswert wären.

Bei der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen scheint das Zusammenspiel mehrerer Faktoren notwendig zu sein (Ananthakrishnan, 2015). Eine gewisse Rolle in der Entstehung von CED kommt sicherlich der Genetik zu. So wurden im Laufe der Zeit eine Vielzahl von Gen-Loci, die mit einem erhöhten CED-Risiko assoziiert sind, identifiziert (Liu et al., 2015). Auch eine Zwillingsstudie in Deutschland konnte einen gewissen, jedoch nicht überwiegenden Einfluss genetischer Faktoren in der CED-Pathogenese beobachten, der bei Morbus Crohn stärker ausgeprägt zu sein schien als bei Colitis ulcerosa (Spehlmann et al., 2008). Für eine bedeutendere Rolle von Umweltfaktoren im Vergleich zur Genetik spricht die Beobachtung, dass Kinder von Immigranten aus Ländern mit niedrigem CED-Risiko im Gegensatz zu ihren Eltern ein mit der Bevölkerung des neuen Heimatlandes vergleichbares, höheres CED-Entstehungsrisiko aufweisen können (Benchimol et al., 2015). Als Umwelt-Risikofaktoren für die Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind beispielsweise der Konsum großer Mengen an Saccharose oder regelmäßiger Verzehr von Fastfood vorbeschrieben, während eine ballaststoffreiche Diät als protektiv angesehen werden kann (Persson et al., 1992). Während Stress bzw. stressreiche Lebensereignisse keine Risikofaktoren für die CED-Entstehung darzustellen scheinen (Lerebours et al., 2007), ist Rauchen als Risikofaktor für die Entstehung von Morbus Crohn nachgewiesen worden (Mahid et al., 2006). Interessanterweise scheint sich aktuelles Rauchen zwar protektiv auf das Risiko, Colitis ulcerosa zu entwickeln, auszuwirken, Nikotinabusus in der Vergangenheit jedoch ist mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Colitis ulcerosa verbunden (Mahid et al., 2006).

Neben den bereits angesprochenen Erkrankungen (s. Kapitel 1.1) sind auch Morbus Crohn und Colitis ulcerosa mit einer Dysbiose der intestinalen Mikrobiota assoziiert, die sich zum einen durch eine Verminderung der Spezies-Diversität auszeichnet (Frank et al., 2007; Lepage et al., 2011; Gevers et al., 2014; Halfvarson et al., 2017). Auch die Zusammensetzung der Mikrobiota von CED-Patienten scheint verändert zu sein. So wurde beispielsweise über

geringere Anteile an Bakterien aus den Stämmen der *Bacteroidetes* und *Firmicutes* und erhöhte Zahlen von Mitgliedern der *Proteobacteria* oder *Actinobacteria* in der CED-Mikrobiota berichtet (Frank et al., 2007; Lepage et al., 2011; Gevers et al., 2014). Für eine wichtige Rolle der intestinalen Mikrobiota in der CED-Entstehung bzw. -Aufrechterhaltung spricht beispielsweise die Beobachtung, dass die Kolonisation von Mäusen mit humaner CED-Mikrobiota zu einer Verstärkung einer experimentell induzierten Colitis führt (Britton et al., 2019). Auch die Möglichkeit einer Verbesserung der klinischen Symptomatik durch Gabe von Breitspektrum-Antibiotika (Wang et al., 2012) oder durch günstige Beeinflussung der intestinalen Dysbiose mittels Stuhltransplantation bei Colitis ulcerosa-Patienten (Paramsothy et al., 2017) können Hinweise auf eine entscheidende Rolle der Mikrobiota im Rahmen der CED-Pathogenese geben. Dennoch liegt ein eindeutiger Beweis für eine kausale Rolle der intestinalen Dysbiose in der Entstehung von CED bisher nicht vor, was weitere Forschung auf diesem Gebiet notwendig macht (Caruso et al., 2020).

Colitis ulcerosa und Morbus Crohn sind weltweit vorkommende Krankheiten, wobei Inzidenz und Prävalenz von Region zu Region unterschiedlich sind. Während sich die CED-Inzidenzen in der westlichen Welt in den letzten Jahren stabilisierten, steigen sie in Schwellenländern in Afrika, Asien und Südamerika mit zunehmender Industrialisierung und Anpassung an den westlichen Lebensstil an, sodass weltweit mit einer zunehmenden Belastung durch CED gerechnet werden kann. Die CED-Prävalenz ist mit über 0,3 % in westlichen Ländern hoch. (Ng et al., 2018) Auch für Deutschland wurde in zurückliegenden Untersuchungen eine hohe Prävalenz von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen festgestellt (Hein et al., 2014). Aufgrund der teils hohen Therapiekosten stellen CED daher auch eine deutliche ökonomische Belastung für das Gesundheitssystem dar (Prenzler et al., 2011; Bokemeyer et al., 2013). Auch mit Blick auf die teils erheblich beeinträchtigte Lebensqualität von CED-Patienten scheint im Kontext einer steigenden globalen und bereits hohen lokalen individuellen und gesamtgesellschaftlichen Belastung durch chronisch entzündliche Darmerkrankungen weitere Forschung zu Pathomechanismen der intestinalen Inflammation von bedeutender Relevanz zu sein.

### 1.3 Das intestinale Immunsystem

Wie bereits angesprochen wird der menschliche Darm von einer Vielzahl von Mikroorganismen besiedelt. Gegenüber der großen Masse an Fremd-Antigenen aus intestinaler Mikrobiota und Nahrungsbestandteilen, mit denen der menschliche Körper somit ständig konfrontiert ist, muss das intestinale Immunsystem tolerant reagieren, um eine andauernde, überschießende Immunreaktion zu vermeiden. Gleichzeitig müssen Infektionen mit pathogenen Mikroorganismen jedoch schnell erkannt und effektiv bekämpft werden, um den Körper ausreichend vor Krankheit zu schützen. Dem intestinalen Immunsystem kommt mit der Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichts eine schwierige und gleichzeitig äußerst wichtige Aufgabe zu. (Caruso et al., 2020)

Besonders wichtig für die adäquate Funktion der intestinalen Immunabwehr ist die Integrität der intestinalen Barriere gegenüber dem Darm-Lumen. Hier bildet das Epithel aus fest miteinander verbundenen Enterozyten eine physikalische Barriere (Bernardo et al., 2018). Der von epithelialen Becherzellen sezernierte Mucus trägt ebenfalls zur räumlichen Trennung von Antigen-reichem Lumen und intestinale Immunsystem bei, kann über bestimmte Bestandteile wie das Mucin MUC2 jedoch auch aktiv Einfluss auf intestinale Immunzellen nehmen und Toleranz fördern (Shan et al., 2013).

Direkt unterhalb des Epithels, in der Lamina propria, sind dendritische Zellen (DCs) als wichtige Elemente der angeborenen Immunabwehr lokalisiert. Erst bei Stimulation des Immunsystems, z.B. durch Pathogene, werden sie in größerem Ausmaß aus der Lamina propria in die Epithelschicht rekrutiert und strecken hier Zellfortsätze zwischen den Enterozyten in das Lumen aus, um potentielle Pathogene durch Phagozytose aufzunehmen. (Farache et al., 2013) Die so aufgenommenen Antigene werden von den dendritischen Zellen in ihrer Funktion als professionell Antigen-präsentierende Zellen (APCs) prozessiert und schließlich mithilfe von *major histocompatibility complex* (MHC)-II-Proteinen auf ihrer Oberfläche präsentiert. Nach Migration in sekundäre lymphatische Organe wie Milz oder Lymphknoten erfolgt die Präsentation der Antigenfragmente gegenüber naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen (TCs), deren konsekutive Aktivierung zu

weiteren, spezifischen Immunreaktionen führt. Während ruhende, immature DCs nur schwache Aktivatoren von T-Zellen sind, zeichnen sich mature dendritische Zellen durch eine erhöhte Oberflächenexpression von MHC-II und costimulatorischen Proteinen wie CD40, CD80 und CD86 aus und können dadurch effektiv T-Zellen stimulieren. (Banchereau & Steinman, 1998) Bestimmte Stimuli wie der intestinale Kommensale *Bacteroides vulgatus* mpk oder niedrigdosiertes Lipopolysaccharid (LPS) können zur Differenzierung von semimaturen DCs führen, die keine proinflammatorischen Reaktionen hervorrufen und auch bei weiterer antigener Stimulation nicht maturieren (Steimle & Frick, 2016). Tatsächlich kommt dendritischen Zellen durch tolerogene Präsentation körpereigener und harmloser kommensaler Antigene so auch eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase zu, was beispielsweise durch das spontane Auftreten von schwerer Autoimmunität in DC-defizienten Mäusen veranschaulicht wurde (Banchereau & Steinman, 1998; Ohnmacht et al., 2009).

Mit Blick auf die wichtige Funktion, die dendritische Zellen in der Steuerung von Immunreaktionen haben, scheint es nachvollziehbar zu sein, dass im Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen veränderte DC-Eigenschaften beobachtet werden konnten. So konnten im Darm von CED-Patienten erhöhte Zahlen maturer DCs verbunden mit gesteigerter Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen nachgewiesen werden (Middel et al., 2006; Baumgart et al., 2009; Baumgart et al., 2011). Während für CD103<sup>+</sup> DCs im Colon gesunder Menschen eine tolerogene Funktion durch Induktion der T<sub>reg</sub>-Differenzierung festgestellt werden konnte, hatte diese DC-Gruppe bei Colitis ulcerosa-Patienten bei gesteigerter Expression proinflammatorischer Zytokine und Induktion von T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen ihre tolerogenen Eigenschaften verloren (Matsuno et al., 2017). Diese Daten geben Hinweise darauf, dass dendritische Zellen eine wichtige Rolle in der CED-Pathogenese einnehmen könnten und lassen weitere Untersuchungen in diesem Bereich sinnvoll erscheinen.

Um im Rahmen ihrer Funktion als APCs Antigene phagozytieren zu können, bedienen sich dendritische Zellen unterschiedlicher sogenannter *pattern*

*recognition receptors* (PRRs), die bestimmte, mit pathogenen Mikroorganismen assoziierte Muster, sogenannte *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs), erkennen. Zu diesen PRRs gehören die Toll-like Rezeptoren (TLRs). (Akira et al., 2006) Da diese nicht nur in der Induktion von Immunreaktionen gegenüber Pathogenen, sondern auch in der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase über Interaktion mit kommensalen Mikroorganismen eine wichtige Rolle einnehmen (Rakoff-Nahoum et al., 2004), werden die von ihnen erkannten Strukturen auch neutral als *microbe associated molecular patterns* (MAMPs) bezeichnet. TLRs kommen auf vielen unterschiedlichen Zelltypen wie DCs, Makrophagen, B-Zellen, bestimmten T-Zellen, Fibroblasten oder Epithelzellen vor (Akira et al., 2006). In Menschen konnten zehn verschiedene TLRs nachgewiesen werden, in Mäusen sogar zwölf, wobei TLR1-9 zwischen Mensch und Maus konserviert sind (Kawai & Akira, 2010). Toll-like Rezeptoren sind teils intrazellulär, teils auf der Zelloberfläche lokalisiert und erkennen jeweils eigene Liganden-Gruppen viralen, bakteriellen, mykotischen oder parasitären Ursprungs, beispielsweise bindet TLR4 bakterielles LPS und TLR3 virale dsRNA (Akira et al., 2006; Fitzgerald & Kagan, 2020). Nach Erkennung und Bindung des jeweiligen MAMPs kommt es über Rekrutierung intrazellulärer Adapterproteine zur Induktion von Signalkaskaden, die schlussendlich beispielsweise zur gesteigerten Produktion proinflammatorischer Zytokine als Teil der Immunreaktion führen (Akira et al., 2006). Da auch für Toll-like Rezeptoren bei CED-Patienten veränderte Expressionsmuster auf dendritischen Zellen beobachtet wurden (Hart et al., 2005), sollten auch diese PRRs bei Forschungen bezüglich der CED-Pathogenese im Blick behalten werden.

Als Vermittler zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem aktivieren PRR-abhängig aktivierte DCs naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen über Interaktion zwischen MHC-II-Antigen-Komplex, costimulatorischen Oberflächenmolekülen und T-Zell-Rezeptor (TCR). Abhängig von TCR-Signal und von den DCs sezernierten Zytokinen differenzieren die aktivierten TCs in unterschiedliche T<sub>H</sub>-Zell-Subgruppen. Diese übernehmen wichtige Funktionen in der Steuerung von Immunreaktionen gegen spezifische Erreger, beispielsweise über Aktivierung der

B-Zell-vermittelten Antikörper-Produktion, Stimulation der Aktivität von Makrophagen oder Rekrutierung von Granulozyten an pathogene Eintrittspforten, wobei von den TCs sezernierten Zytokinen und Chemokinen eine bedeutsame Rolle zukommt. (Zhu & Paul, 2008; Zhu, 2018)

Im Kontext von CED besonders erwähnenswert sind  $T_H17$ -Zellen, die eine wichtige Rolle im Schutz des Organismus vor bakteriellen und mykotischen Infektionen spielen (Zhu, 2018). So wirken sich  $T_H17$ -Zellen und das für sie charakteristische Zytokin IL-17 protektiv gegenüber oraler mukosaler Candidose aus (Conti et al., 2009) und angeborene Defekte des  $T_H17$ -Systems können mit der Entwicklung einer chronischen mukokutanen Candidose assoziiert sein (Okada et al., 2016). Auch kann die Induktion von  $T_H17$ -Zellen in Mäusen durch kommensale *segmented filamentous bacteria* (SFB) zu besserem Schutz vor intestinaler Infektion mit dem Pathogen *Citrobacter rodentium* führen (Ivanov et al., 2009). Auf der anderen Seite konnten Erhöhungen an  $T_H17$ -Zellen oder von IL-17 in der entzündeten intestinalen Mukosa von CD- und UC-Patienten in mehreren Studien nachgewiesen werden (Annunziato et al., 2007; Kleinschek et al., 2009; Veny et al., 2010), was für eine potentielle Rolle dieser  $T_H$ -Zell-Subgruppe in der CED-Pathogenese sprechen könnte (Liu et al., 2009; Owaga et al., 2015). Dass IL-17-defiziente Mäuse mildere Verläufe von experimenteller Dextran-Natriumsulfat-induzierter Colitis (DSS-Colitis) erleben (Ito et al., 2008) und die Kolonisation von Mäusen mit humaner CED-Mikrobiota zu einer Verschlimmerung der experimentellen Colitis, assoziiert mit erhöhten Zahlen an  $T_H2$ - und  $T_H17$ -Zellen, führt (Britton et al., 2019), kann diese Hypothese unterstützen. Park et al. konnten in Mäusen durch probiotische Behandlung mit *Lactobacillus acidophilus*, die in erhöhten  $T_{reg}$ - und verminderten  $T_H17$ -Zahlen resultierte, den Verlauf einer DSS-Colitis positiv beeinflussen, was auf eine wichtige Rolle des Gleichgewichts zwischen diesen beiden Zell-Gruppen in der CED-Pathogenese hinweisen könnte (Park et al., 2018). Trotz der genannten Beobachtungen erwies sich die Behandlung von Morbus Crohn-Patienten mit anti-IL-17-Antikörpern nicht nur als ineffektiv, sondern war auch mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden (Hueber et al., 2012). Ustekinumab, ein monoklonaler Antikörper gegen die p40-Untereinheit der mit  $T_H17$

assoziierten Zytokine IL-12 und IL-23, wird hingegen erfolgreich in der Behandlung von Morbus Crohn-Patienten eingesetzt (Feagan et al., 2016). Zusammenfassend scheinen damit bezüglich der Rolle von T<sub>H</sub>17-Zellen in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen viele Fragen ungeklärt und weitere Untersuchungen notwendig zu sein. Als wichtige Elemente des Immunsystems und gleichzeitig potentiell Beteiligte in der Entstehung chronischer Inflammation scheinen T<sub>H</sub>17-Zellen eine ambivalente Funktion auszuüben. (Stockinger & Omenetti, 2017)

## 1.4 Die Proteine MCPIP1 und I $\kappa$ B $\zeta$

*Monocyte chemotactic protein-induced protein 1* (MCPIP1, Regnase-1, ZC3H12A) ist ein Zinkfinger-Protein, das zur Gruppe der RNA-bindenden Proteine, zu der beispielsweise auch die Proteine Tristetraprolin und Roquin-1 gehören, gezählt wird (Fu & Blackshear, 2017). Seine Funktion übt MCPIP1 mithilfe seiner RNase-Aktivität als Endonuklease aus (Matsushita et al., 2009). Als intrazellulär, am rauen Endoplasmatischen Retikulum lokalisiertes Protein bindet MCPIP1 seine Ziel-RNAs über eine Haarnadelstruktur (*stem-loop*) in deren 3'-untranslatierter Region, wobei nur translational aktive mRNAs abgebaut werden (Mino et al., 2015).

Die Expression von MCPIP1 wird beispielsweise in Makrophagen durch Stimulation mit bakteriellem LPS induziert. Da die LPS-induzierte Aktivierung der Makrophagen durch das gleichzeitig induzierte MCPIP1 reduziert wird, kann MCPIP1 auch als Feedback-Inhibitor der Makrophagen-Aktivität nach bakterieller Stimulation gesehen werden. (Liang et al., 2008) Generell wird MCPIP1 eine wichtige Rolle als Regulator von Immunreaktionen zugeschrieben. So bilden MCPIP1-defiziente Mäuse Autoantikörper, weisen neben einer Wachstumsretardierung eine Splenomegalie und Lymphadenopathie auf und sterben in der Regel innerhalb weniger Wochen (Matsushita et al., 2009). Verbunden ist die in MCPIP1-defizienten Mäusen beobachtete generalisierte Inflammation mit einer erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine in

Makrophagen, was eine regulatorische Funktion von MCPIP1 in diesen Zellen unterstreicht (Liang et al., 2010). Als molekulare Zielstrukturen der Endonuklease MCPIP1 konnten mRNAs proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 oder IL-12 identifiziert werden (Matsushita et al., 2009; Mino et al., 2015).

Eine regulatorische Funktion konnte für MCPIP1 auch in T-Zellen beobachtet werden. Hier scheint die konstitutive Expression von MCPIP1 eine ständige Aktivierung der T-Zellen zu verhindern. Die Entwicklung schwerer Autoimmunerkrankungen in Mäusen mit TC-spezifischer MCPIP1-Defizienz unterstreicht diese Funktion und verdeutlicht die Relevanz von MCPIP1 als Immunregulator. Um adäquate TC-abhängige Immunreaktionen zu ermöglichen, kommt es in T-Zellen nach TCR-Aktivierung zur Erhöhung der Aktivität von *mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1* (MALT1), einer Protease, die MCPIP1 spaltet und dadurch proinflammatorische Signale, die zur gewünschten Immunaktivierung führen, freigibt. (Uehata et al., 2013)

Auch im Zusammenhang mit der  $T_H17$ -Differenzierung scheint MCPIP1 eine Funktion einzunehmen. Knockout-Modelle zeigten, dass MCPIP1 in Kooperation mit dem RNA-bindenden Protein Roquin-1 die Entwicklung in  $T_H17$ -Richtung und die Produktion von IL-17 hemmt. Auch in diesem Zusammenhang kann, in Abhängigkeit von der Stärke des TCR-Signals, die  $T_H17$ -Differenzierung durch MALT1-vermittelte Spaltung von Roquin-1 und MCPIP1 induziert werden. (Jeltsch et al., 2014) Einen weiteren Hinweis auf den  $T_H17$ -supprimierenden Effekt von MCPIP1 konnten Garg et al. in Versuchen mit MCPIP1-haploinsuffizienten Mäusen (*Zc3h12a<sup>+/-</sup>*), bei denen die IL-17-vermittelte Protektion gegenüber *Candida albicans*-Infektionen, aber auch IL-17-assoziierte Pathologien wie pulmonale Inflammation und experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) verstärkt ausgeprägt waren, entdecken. Auch konnte die mRNA des IL-17-Rezeptors als Zielstruktur von MCPIP1 identifiziert werden. (Garg et al., 2015)

Das Protein NF- $\kappa$ B-Inhibitor zeta ( $I\kappa B\zeta$ , MAIL, NFKBIZ) gehört zur Familie der atypischen, nukleären *inhibitor of NF- $\kappa$ B*-Proteine ( $I\kappa B$ ), die eine wichtige Funktion in der Regulation des *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of*

*activated B cells* (NF- $\kappa$ B), der als Transkriptionsfaktor eine entscheidende Rolle unter anderem in der Steuerung von Immunreaktionen spielt (Zhang et al., 2017), ausüben (Annemann et al., 2016). I $\kappa$ B $\zeta$  vermittelt zunächst eine regulierende Wirkung, indem es mit der p50-Untereinheit von NF- $\kappa$ B assoziiert und dadurch die DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B verhindert (Yamazaki et al., 2001; Motoyama et al., 2005). Gleichzeitig kann I $\kappa$ B $\zeta$  nach Assoziation mit der p50-Untereinheit selbst an bestimmte Ziel-Gene binden und so eine selektive transkriptionssteigernde Wirkung, zum Beispiel für IL-6, entfalten (Yamamoto et al., 2004).

In unterschiedlichen Geweben ist I $\kappa$ B $\zeta$  in ruhenden Zellen meist unterhalb der Nachweisgrenze exprimiert, wird aber nach immunogener Stimulation mit beispielsweise LPS ausgeprägt induziert (Kitamura et al., 2000; Yamazaki et al., 2001). Die intrazelluläre Induktion von I $\kappa$ B $\zeta$  erfolgt neben LPS über diverse andere TLR-Liganden oder den IL-1-Rezeptor-Pathway, nicht aber über den TNF-Signalweg (Yamamoto et al., 2004). TNF- $\alpha$  führt zwar zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B, stabilisiert die I $\kappa$ B $\zeta$ -mRNA jedoch nicht, was zusätzlich zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung für die Induktion von I $\kappa$ B $\zeta$  notwendig wäre (Yamamoto et al., 2004).

Studien mit I $\kappa$ B $\zeta$ -defizienten Mäusen zeigen, dass das Protein eine bedeutsame Rolle für den Organismus zu spielen scheint. So sterben 90 % der I $\kappa$ B $\zeta$ -Knockout-Mäuse bereits *in utero* und die übrigen entwickeln bereits kurz nach der Geburt spontane Autoimmunität mit Hautläsionen ähnlich einer atopischen Dermatitis (Yamamoto et al., 2004; Shiina et al., 2004). Gleichzeitig wurde für I $\kappa$ B $\zeta$ -defiziente Mäuse eine erhöhte Resistenz gegenüber experimentell induzierter Enzephalomyelitis beschrieben, einer mit T<sub>H</sub>17-Zellen assoziierten Pathologie. Tatsächlich konnte in den I $\kappa$ B $\zeta$ -Knockout-Mäusen ein Defekt in der T<sub>H</sub>17-Differenzierung beobachtet werden, der der EAE-Protektion zugrunde zu liegen scheint. Während kein Effekt von I $\kappa$ B $\zeta$  in der Entwicklung von T<sub>reg</sub>-Zellen nachgewiesen werden konnte, scheint die Kooperation von I $\kappa$ B $\zeta$  und dem T<sub>H</sub>17-charakteristischen Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t essentiell für die Differenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen zu sein. (Okamoto et al., 2010) Interessanterweise konnte eine Behandlung mit Dimethylitaconat durch Inhibition der Induktion von I $\kappa$ B $\zeta$  in einem Maus-Modell für die ebenfalls T<sub>H</sub>17-assoziierte

Erkrankung Psoriasis die Entwicklung der typischen Hautläsionen verhindern, was eine pathologische Rolle von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  in der Pathogenese  $\text{T}_\text{H}17$ -assoziierter Krankheiten unterstreicht und eventuelle therapeutische Optionen bezüglich dieses Proteins aufzeigt (Bambouskova et al., 2018).

Mit Blick auf die genannten  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -assozierten Pathologien scheint eine strenge Kontrolle der  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -Expression mit dem Ziel, eine zu geringe oder zu starke Aktivität zu vermeiden, von großer Bedeutung zu sein. In der  $\text{T}_\text{H}17$ -Differenzierung konnte diesbezüglich eine Interaktion zwischen den beiden vorgestellten Proteinen  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  und MCPIP1 beobachtet werden. So geht die gesteigerte  $\text{T}_\text{H}17$ -Differenzierung von T-Zellen bei MALT1-vermittelter Spaltung von MCPIP1 mit einer erhöhten  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -Expression einher (Jeltsch et al., 2014). Tatsächlich wird die mRNA von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  als Zielstruktur der Endonuklease MCPIP1 abgebaut, was unter anderem zur Funktion von MCPIP1 als Feedback-Inhibitor des  $\text{T}_\text{H}17$ /IL-17-Signalwegs beiträgt (Garg et al., 2015).

Nicht nur aufgrund ihrer Rolle bezüglich der Differenzierung und Funktion von  $\text{T}_\text{H}17$ -Zellen könnten  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  und MCPIP1 in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beteiligt sein. Neue Arbeiten konnten im intestinalen Epithel von Colitis ulcerosa-Patienten gehäuft somatische Mutationen des für  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  codierenden *NFKBIZ*-Gens, aber auch des Gens *ZC3H12A*, das für MCPIP1 codiert, nachweisen, was eine mögliche Funktion der beiden Proteine in der CED-Pathogenese unterstreichen könnte (Kakiuchi et al., 2020; Nanki et al., 2020). Mit Blick auf die angesprochene, therapeutisch vielversprechende Möglichkeit der  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -Inhibition bei Psoriasis im Maus-Modell (Bambouskova et al., 2018) könnte auch weitere Forschung bezüglich  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  und MCPIP1 in der Entstehung und Aufrechterhaltung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen neue Therapie-Ansätze hervorbringen.

## 1.5 Wissenschaftliche Fragestellungen

Wie bereits erläutert, können Morbus Crohn und Colitis ulcerosa als chronische, teils schwer verlaufende Krankheiten mit zum Teil erheblicher Symptomatik für die betroffenen Patienten eine große Beeinträchtigung darstellen und mit einem nachhaltigen Verlust an Lebensqualität einhergehen. Als globale Erkrankungen mit steigenden Fallzahlen in vielen Regionen der Welt, stellen sie nicht nur für die Gesellschaft in Deutschland eine erhebliche sozioökonomische Belastung dar. Bei noch nicht vollständig verstandenen Entstehungsmechanismen der Krankheiten ist die weiterführende Forschung im Bereich der CED-Pathogenese ein wichtiger Schritt, um die gesellschaftlichen Beeinträchtigungen und vor allem das Leiden der einzelnen Patienten mithilfe möglicher neuer Präventions- und Therapieansätze verringern zu können.

Die vorausgehend zitierten Arbeiten konnten zeigen, dass die intestinale Mikrobiota wichtige Funktionen für den menschlichen Körper erfüllt und sich im Rahmen von Erkrankungen sowohl positiv als auch negativ auswirken kann. Auch in der Pathogenese von CED scheint intestinale Mikrobiota und intestinales Immunsystem eine bedeutsame Rolle zuzukommen. Eine besondere Position könnte hierbei die Gruppe der T<sub>H</sub>17-Zellen einnehmen. Als Vermittler zwischen Mikrobiota und adaptivem Immunsystem im Darm könnten dendritische Zellen bei der mikrobiellen Beeinflussung von Immunreaktionen von zentraler Bedeutung sein. Nachdem I $\kappa$ B $\zeta$  und MCPIP1 als Regulatoren der T<sub>H</sub>17-Differenzierung in T-Zellen identifiziert und Mutationen der für diese Proteine codierenden Gene in Colitis ulcerosa-Patienten nachgewiesen wurden, stellte sich die Frage, welche Funktion I $\kappa$ B $\zeta$  und MCPIP1 in dendritischen Zellen einnehmen und ob sich eine differentielle mikrobielle Umwelt unterschiedlich auf ihre Expression und die damit verbundene DC-Funktion auswirkt.

Im Rahmen dieser Studie sollten die Bakterien *Bacteroides vulgatus* mpk und *Escherichia coli* mpk als Modell-Kommensale stellvertretend für symbiontische bzw. pathobiontische intestinale Organismen verwendet werden. Nachdem zurückliegende Untersuchungen der Arbeitsgruppe eine colitogene Wirkung von *E. coli* mpk bzw. protektive Effekte von *B. vulgatus* mpk in verschiedenen

murinen Colitis-Modellen aufdeckten (Waidmann et al., 2003; Steimle et al., 2019) und diese mit differentieller Aktivierung dendritischer Zellen durch die beiden Modellorganismen in Verbindung gebracht wurden (Müller et al., 2008), sollte in dieser Arbeit der Einfluss symbiontischer und pathobiontischer Bakterien auf die I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCPIP1-Expression in dendritischen Zellen, die damit verbundenen funktionellen Veränderungen und Auswirkungen auf weitere Zellen des intestinalen Immunsystems untersucht werden. Konkret lagen der Studie die folgenden wissenschaftlichen Fragestellungen zugrunde:

1. Welchen Einfluss haben *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk auf die MCPIP1- und I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression in dendritischen Zellen?
2. Wie wirken sich unterschiedlich zusammengesetzte intestinale Mikrobiota auf die MCPIP1- und I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression in dendritischen Zellen aus?
3. Über welche Signalwege beeinflussen *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk die Aktivität dendritischer Zellen?
4. Welchen Einfluss haben unterschiedlich bakteriell stimulierte dendritische Zellen auf die Aktivität anderer, immaturer DCs und die Differenzierung naiver T-Zellen?
5. Welchen Einfluss haben *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk auf die MCPIP1- und I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression in intestinalen Epithelzellen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Mäuse

Für die Isolation von Knochenmark zur Generierung von *bone marrow derived dendritic cells* (BMDCs) wurden C57BL/6-Mäuse von *Charles River Laboratories* und *Tlr2*<sup>-/-</sup>, *Tlr4*<sup>-/-</sup> und *Tlr2*<sup>-/-</sup>*xTlr4*<sup>-/-</sup>-Mäuse aus eigener Zucht verwendet. Es wurden überwiegend weibliche Mäuse im Alter zwischen ca. zwei und sechs Monaten eingesetzt. Die Isolation naiver T-Zellen erfolgte aus männlichen und weiblichen C57BL/6-Mäusen im Alter von ca. vier Monaten. Alle Mäuse wurden unter Standardbedingungen in einer *Specific-Pathogen-Free* (SPF)-Flora in individuell ventilierten Käfigen (TLR-Knockout-Mäuse) bzw. in offener Haltung (Wildtyp-Mäuse) gehalten. Die Verwendung der Mäuse für die Isolation von Knochenmark und naiven T-Zellen wurde im Rahmen von Mitteilungen nach § 4 Abs. 3 TierSchG vom 09.01.2015 (TLR-Knockout-Mäuse) bzw. 14.06.2017 (Wildtyp-Mäuse) durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

#### 2.1.2 Bakterien

Als Modellorganismen für symbiontische bzw. pathobiontische Bakterien wurden *Bacteroides vulgatus* mpk bzw. *Escherichia coli* mpk verwendet. Beide Bakterien wurden ursprünglich aus dem Darm von *IL-2*<sup>-/-</sup>-Mäusen, die unter SPF-Bedingungen gehalten wurden und eine Colitis entwickelten, isoliert (Waidmann et al., 2003).

#### 2.1.3 Zelllinien

Für die Zellkultur-Versuche mit Epithelzellen wurden murine intestinale Epithelzellen der Zelllinie mIC<sub>cl2</sub> verwendet (Bens et al., 1996).

## 2.1.4 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Tab. 1: Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
BioPhotometer	Eppendorf
Durchflusszytometer LSRFortessa	BD
ELISA-Reader Infinite F50	Tecan
ELISA-Washer Columbus plus	Tecan
LightCycler 480	Roche
Nanodrop One	Thermo Fisher
QuadroMACS-Magnet	Miltenyi Biotec

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller
12-Well-Platte Cellstar, oberflächenbehandelt	Greiner Bio-One
6-Well-Platte Cellstar, oberflächenbehandelt	Greiner Bio-One
96 Well-Platte, V-Boden, unsteril (FACS)	Greiner Bio-One
96-Well-Platte Nunc MaxiSorp (ELISA)	Thermo Fisher
96-Well-Platte, Nunclon Delta-treated	Thermo Fisher
Acrodisc Syringe Filter, 0,2 µm	Pall
Kanüle Microlance, 27 G	BD
Kultur-Röhrchen, 5 ml	Falcon (Fisher Scientific)
LightCycler 480 Multiwell Plate 96	Roche
LS Columns (MACS)	Miltenyi Biotec
Photometer-Küvette	Sarstedt
Reaktionsgefäß Safe-Lock Tube, 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß Safe-Lock Tube, 2 ml	Eppendorf
Spritze 10 ml, steril	B. Braun
Spritze 20 ml, steril	B. Braun
Zellfilter EASYstrainer, 100 µm	Greiner Bio-One
Zellkultur-Flasche Cellstar, 250 ml	Greiner Bio-One
Zellkultur-Petri-Schale	Greiner Bio-One

Zellkultur-Platte 12-Well, steril	Falcon (Fisher Scientific)
Zellkultur-Platte 24-Well, steril	Falcon (Fisher Scientific)
Zellkultur-Platte 6-Well, steril	Falcon (Fisher Scientific)
Zellschaber, steril	Corning (Fisher Scientific)
Zentrifugenröhrchen 15 ml, steril	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen 50 ml, steril	Falcon (Fisher Scientific)

Tab. 3: Chemikalien

Produktbezeichnung	Hersteller
3,3',5-Triiodo-L-Thyronin-Natrium-Salz (T <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich
Advanced DMEM/F-12	Gibco (Thermo Fisher)
Ampuwa	Fresenius Kabi
Aqua ad iniectabilia	B. Braun
Cytofix/Cytoperm	BD
Dexamethason, wasserlöslich	Sigma-Aldrich
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Gibco (Thermo Fisher)
EGF (Maus)	Sigma-Aldrich
ELISA TMB Substrate Reagent Set	BD
Ethanol absolut	PanReac AppliChem
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco (Thermo Fisher)
Fc-Block	eigene Herstellung
FVD (Fixable Viability Dye) eFluor 450	eBioscience (Thermo Fisher)
FVD (Fixable Viability Dye) eFluor 780	eBioscience (Thermo Fisher)
GM-CSF	eigene Herstellung
GolgiStop Protein-Transport-Inhibitor	BD
HEPES-Puffer (1 M)	Biochrom
Insulin-Transferrin-Selen (ITS-G) (100x)	Gibco (Thermo Fisher)
LAC (Leucocyte Activation Cocktail)	BD
L-Glutamin (200 mM) (100x)	Gibco (Thermo Fisher)
Natrium-Pyruvat (100 mM)	Biochrom

NEA (Non-Essential Amino Acids) (100x)	Biochrom
Oxoid AnaeroGen, 2,5 l	Thermo Fisher
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Gibco (Thermo Fisher)
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco (Thermo Fisher)
Rekombinantes Maus-IL-6 (rIL-6)	BioLegend
Rekombinantes RNasin	Promega
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco (Thermo Fisher)
UltraComp eBeads Compensation Beads	Invitrogen (Thermo Fisher)
VLE-RPMI 1640 Medium (mit 2.0 g/l NaHCO <sub>3</sub> , ohne L-Glutamin)	Biochrom
β-Mercaptoethanol (β-ME)	PanReac AppliChem
LB-Medium	BD
BHI-Medium	Merck

### 2.1.5 Puffer und Medien (eigene Herstellung)

Tab. 4: Puffer und Medien (eigene Herstellung)

Puffer/Medium	Zusammensetzung
DC-Medium	VLE-RPMI 1640 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 6 % GM-CSF 1 % NEA 1 % Penicillin/Streptomycin 0,5 % DPBS + 0,08 % β-ME
ELP (Erythrozyten-Lysepuffer)	H <sub>2</sub> O 8,3 g/l NH <sub>4</sub> Cl 3,7 g/l Na <sub>2</sub> EDTA 1 g/l NaHCO <sub>3</sub>

mIC-Medium	Advanced DMEM/F-12 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 1 % L-Glutamin 1 % ITS-G 0,1 % EGF 0,1 % Penicillin/Streptomycin 0,01 % T <sub>3</sub> 0,001 % Dexamethason
Perm/Wash-Puffer	DPBS 10 % DPBS + 1 % Saponin 3 % FCS (hitzeinaktiviert)
TC-Medium	VLE-RPMI 1640 15 % FCS (hitzeinaktiviert) 50 mM HEPES 2 % Natrium-Pyruvat 1 % NEA 1 % Penicillin/Streptomycin 0,5 % DPBS + 0,08 % β-ME

## 2.1.6 Kits

Tab. 5: Kits

Produktbezeichnung	Hersteller
DNA-free DNase-Kit	Invitrogen (Thermo Fisher)
ELISA-Kit OptEIA Mouse IL-10	BD
ELISA-Kit OptEIA Mouse IL-1β	BD
ELISA-Kit OptEIA Mouse IL-6	BD
ELISA-Kit OptEIA Mouse TNF	BD
MACS Naive CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit Mouse	Miltenyi Biotec
QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen
Quantikine ELISA Mouse IL-23	R&D Systems
RNeasy Mini Kit	Qiagen

## 2.1.7 Antikörper

Tab. 6: FACS-Antikörper

Antikörper	Fluorophor	Klon	Hersteller
Hamster anti-Mouse CD11c	PE-Cy7	HL3	BD
Hamster anti-Mouse CD11c	APC	HL3	BD
Hamster anti-Mouse CD3 $\epsilon$	FITC	145-2C11	BD
Mouse anti-Mouse I-A[b]	APC	AF6-120.1	BD
Mouse anti-Mouse I-A[b]	BV421	AF6-120.1	BD
Mouse anti-Mouse ROR $\gamma$ t	BV421	Q31-378	BD
Rabbit anti-MCPIP1	FITC	polyklonal	Biorbyt
Rat anti-Mouse CD25	APC	PC61	BD
Rat anti-Mouse CD4	BV605	RM4-5	BD
Rat anti-Mouse CD4	BV421	GK1.5	BD
Rat anti-Mouse CD45RB	PE	16A	BD
Rat anti-Mouse FoxP3	Alexa Fluor 647	MF23	BD
Rat anti-Mouse I $\kappa$ B $\zeta$	PerCP-eFluor 710	LK2NAP	eBioscience
Rat anti-Mouse IFN- $\gamma$	PE-Cy7	XMG1.2	BD
Rat anti-Mouse IFN- $\gamma$	APC	XMG1.2	BD
Rat anti-Mouse IL-10	FITC	JES5-16E3	BioLegend
Rat anti-Mouse IL-17A	PE	TC11-18H10	BD
Rat anti-Mouse IL-4	PE	11B11	BD

Tab. 7: Sonstige Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller
Hamster anti-Mouse CD28	37.51	BioLegend
Hamster anti-Mouse CD3 $\epsilon$	145-2C11	BioLegend
Rat anti-Mouse IL-6	MP5-20F3	BioLegend

### 2.1.8 Primer

Die Sequenzen der für die Analyse der Zielgene verwendeten Primer wurden mithilfe der Datenbank *Primer-BLAST* der *U.S. National Library of Medicine* generiert. Vor ihrer experimentellen Verwendung wurde die Qualität der Primer im Rahmen eines umfangreichen Evaluationsprozesses sichergestellt.

**Tab. 8: Primer**

Primer	Primersequenz	Hersteller
I $\kappa$ B $\zeta$	Fw.: GTGGGAGAACAGATCCGACG Rv.: AGTGAGTGTCGCTGAACCAG	biomers.net
MCPIP1	Fw.: GCCTATCACAGACCAGCACA Rv.: ACGTGTCATTGGAGACCACC	biomers.net
$\beta$ -Aktin	Fw.: CCCTGTGCTGCTCACCGA Rv.: ACAGTGTGGGTGACCCCGTC	biomers.net

### 2.1.9 Software

**Tab. 9: Software**

Produktbezeichnung	Hersteller
FlowJo	BD
GraphPad Prism	GraphPad Software
LightCycler 480 Software	Roche

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung der Bakterien

#### 2.2.1.1 *E. coli* mpk-Kultur

Vor den Stimulationsversuchen wurde *E. coli* mpk im Rahmen einer Übernacht-Kultur vermehrt. Dazu wurde am Vortag der Stimulation ein Aliquot des bei -20 °C gelagerten *E. coli* mpk-Vorrats unter sterilen Bedingungen in ein Kultur-Röhrchen mit 5 ml LB-Medium überführt, welches über Nacht aerob schüttelnd bei 37 °C inkubierte. Am Stimulationstag wurden 300 µl der Übernachtkultur in 20 ml *Luria-Bertani* (LB)-Medium überführt und im Erlenmeyer-Kolben bis zur Stimulation aerob schüttelnd bei 37 °C als Subkultur inkubiert.

#### 2.2.1.2 *B. vulgatus* mpk-Kultur

Aufgrund seiner langsamen Wachstumseigenschaften wurde *B. vulgatus* mpk bereits fünf Tage vor der eigentlichen Stimulation in Kultur genommen. Zum Start der Kultur wurde ein Aliquot des bei -20 °C gelagerten *B. vulgatus* mpk-Vorrats unter sterilen Bedingungen in ein Leber-Kultur-Röhrchen überführt und anschließend für drei Tage anaerob bei 37 °C inkubiert. Am dritten Inkubationstag wurden aus dem trüben Schleier, der sich im Röhrchen um die Leber gebildet hatte, 5 ml entnommen und in einen Erlenmeyer-Kolben mit 50 ml *Brain-Heart-Infusion* (BHI)-Medium gegeben. Dieser Ansatz wurde für weitere zwei Tage bis zur Stimulation anaerob bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.2 Gewinnung der Mikrobiota-Suspensionen

Um nicht nur die Auswirkung einzelner Bakterien-Stämme, sondern auch komplex zusammengesetzter intestinaler Flora auf damit stimulierte BMDCs untersuchen zu können, wurden Suspensionen intestinaler Mikrobiota von Mäusen, die unterschiedliche Behandlungen erfahren hatten, hergestellt. Dazu wurden Kot-Proben, die in einem früheren Experiment von *Rag1*<sup>-/-</sup>-Mäusen gesammelt und bei -80 °C gelagert worden waren, aufbereitet. Es konnten Kot-Proben von drei verschiedenen behandelten Maus-Gruppen verarbeitet werden: *Rag1*<sup>-/-</sup>-Mäuse, die keine Behandlung erfahren hatten, bei denen

aufgrund der genetischen Veränderung jedoch von einer dysbiotischen intestinalen Mikrobiota (*DYS*) auszugehen war, Tiere, die nach intraperitonealer Applikation von T-Zellen eine T-Zell-Transfer-Colitis entwickelt hatten (*DYS+TC*) und Mäuse, die an einer T-Zell-Transfer-Colitis gelitten hatten und zusätzlich mit *B. vulgatus* mpk über das Trinkwasser kolonisiert worden waren (*DYSBV*). Kot-Proben von je zwei Tieren der einzelnen Gruppen wurden aufgetaut und in sterilen Reaktionsgefäßen gepoolt. Da in den Stimulationsexperimenten nur die Auswirkung von Mikrobiota-Bestandteilen auf dendritische Zellen und nicht die Interaktion mit vitalen Mikroorganismen von Interesse war, wurden die Kot-Proben für 10 min bei einer Temperatur von 80 °C trocken Hitze-inaktiviert. Anschließend wurden die Proben in sterilem DPBS resuspendiert und auf eine Konzentration von 50 mg/ml eingestellt. Diese Suspension wurde mithilfe eines Zellfilters (100 µm) von großen Kot-Bestandteilen befreit. Um verbleibende größere Partikel aus dem Filtrat zu entfernen, wurde nach kurzer Ruhezeit nur der Überstand in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt, während das Sediment belassen wurde. Zur Überprüfung der so gewonnenen Mikrobiota-Suspensionen auf Vitalität wurden Proben entnommen und auf Blutagar bei 37 °C für einige Tage inkubiert. Bei trotz Hitze-Inaktivierung noch nachweisbarem Keim-Wachstum wurden die Suspensionen erneut bei 80 °C für 10 min inaktiviert. Die so sterilisierten Mikrobiota-Suspensionen wurden bis zu ihrer Verwendung bei einer Temperatur von -20 °C gelagert.

### 2.2.3 Gewinnung der Überstände-Pools

Zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlich konfigurierter Zytokin-Lösungen auf bestimmte Zelltypen wurden im Rahmen von BMDC-Stimulationsexperimenten mit Bakterien als Stimulantien Pools von Überständen der stimulierten Zellen gewonnen. Nach wie in Kapitel 2.2.4.4 beschriebener Stimulation von Wildtyp-BMDCs mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk für eine Stimulationsdauer von 16 h wurden die Zellen mittels Zellschaber aus ihren Wells gelöst und in Reaktionsgefäße überführt. Durch Zentrifugation der Zellsuspensionen für 5 min bei 400 g konnten Zytokin-haltiges Medium und Zellen voneinander getrennt werden. Die Überstände wurden aus den

Reaktionsgefäßen abgenommen und nach Stimulus in Zentrifugenröhrchen als *B. vulgatus* mpk-Pool (*BV-ÜS*) und *E. coli* mpk-Pool (*EC-ÜS*) gesammelt. Überstände der unstimulierten Kontrollen wurden in einem Zentrifugenröhrchen als *mock*-Pool (*mock-ÜS*) gesammelt. Um in den Überständen verbliebene Bakterien und mögliche Kontaminationen während der unsterilen Abnahme beseitigen zu können, mussten die Überstände-Pools vor ihrem Einsatz als Stimulationslösungen mittels steriler Filtration aufbereitet werden. Die so sterilisierten Überstände-Pools wurden, um einem Zerfall der enthaltenen Zytokine vorzubeugen, bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### **2.2.4 Zellkultur mit murinen dendritischen Zellen**

#### **2.2.4.1 Isolation der BMDCs**

Die verwendeten BMDCs wurden sieben Tage vor Stimulation aus dem Knochenmark der Versuchsmäuse isoliert. Dazu wurden die Tiere durch Begasung mit Kohlenstoffdioxid und anschließende zervikale Dislokation euthanasiert. Nach Fixierung der jeweiligen Maus an den Extremitäten mittels Kanülen erfolgte die sorgfältige Desinfektion des Fells. Nach Inzision der Haut im Oberschenkel-Bereich mit sterilisiertem Präparationsbesteck wurden Ober- und Unterschenkelmuskulatur zunächst vom subkutanen Fettgewebe abpräpariert und schließlich vom Knochen abgelöst. Auf diese Weise freigelegt, konnten Femur und Tibia an Hüfte und Sprunggelenk abgesetzt und in eiskaltem sterilen DPBS gelagert werden. Von jeder Maus wurden beide untere Extremitäten auf diese Weise präpariert und mausweise weiterverarbeitet. Um Kontaminationen zu vermeiden, erfolgten die weiteren Isolationsschritte unter sterilen Bedingungen unter der Clean-Bench. Nachdem verbliebenes Muskelgewebe von den Knochen entfernt worden war, wurden Femur und Tibia durch Entfernen des Kniegelenks voneinander getrennt. Die an den Schnittstellen eröffneten Markhöhlen der Knochen wurden unter Zuhilfenahme einer 10 ml-Spritze mit Kanüle (27 Gauge) mit sterilem DPBS gespült. Das so ausgelöste Knochenmark wurde in einem Zellfilter (100 µm) aufgefangen und schließlich mit dem sterilen Stempel der Spritze in ein steriles 50 ml-Zentrifugenröhrchen passiert. Die Zellsuspension in DPBS wurde anschließend für 5 min bei 400 g zentrifugiert, der

Überstand dekantiert und das verbliebene Zellpellet in 10 ml auf 37 °C vorgewärmtem DC-Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl in dieser Suspension wurde eine 1:10-Verdünnung mit Trypan-Blau angefertigt, die mithilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop quantifiziert wurde. Hierbei wurden nur nicht angefärbte, vitale Zellen berücksichtigt. Die Berechnung der Konzentration  $c$  isolierter vitaler Knochenmarkszellen pro Milliliter Suspension nach Zählen von  $z$  Zellen in  $q$  Großquadraten einer Trypan-Blau-Verdünnung des Verdünnungsfaktors  $v$  mithilfe einer Neubauer-Zählkammer mit dem Kammerfaktor  $10^4$  erfolgte nach folgender Formel:

$$c = \frac{z}{q} \cdot 10^4 \cdot v$$

Für die Kultur wurden abschließend pro Maus ca. 20-40 Petri-Schalen mit  $2 \cdot 10^6$  Zellen in 10 ml DC-Medium pro Schale ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert.

#### **2.2.4.2 Kultivierung der BMDCs**

Am zweiten Tag nach Isolation wurden nach makroskopischer Kontrolle auf eventuelle Kontaminationen in jede Petri-Schale 10 ml frisches DC-Medium zugefügt. Um am fünften Tag nach Isolation verbrauchtes gegen neues Medium austauschen zu können, wurden zunächst aus jeder Petri-Schale 10 ml DC-Medium entnommen und mausweise in sterilen Zentrifugenröhrchen gepoolt. Um nicht-adhärenente Zellen nicht zu verlieren, wurden diese für 5 min bei 400 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die verbliebenen Zellpellets in allen Zentrifugenröhrchen einer Maus in insgesamt 10 ml frischem, auf 37 °C vorgewärmtem DC-Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf zehn Petri-Schalen der entsprechenden Maus verteilt. Zusätzlich wurden jeder Petri-Schale 10 ml an frischem DC-Medium zugefügt und alle Kultur-Schalen schließlich weiter bis zum Stimulationstag inkubiert.

#### **2.2.4.3 Vorbereitung der BMDCs für die Stimulation**

Am Stimulationstag erfolgte zunächst die mikroskopische Beurteilung von Wachstum und Differenzierung der kultivierten Zellen. Als Kriterien für eine angemessene Differenzierung wurden Adhärenz der Zellen und die Ausbildung

von Zellfortsätzen angesehen. Schlecht gewachsene oder unzureichend differenzierte Zellen wurden verworfen und nicht für die Stimulationsversuche verwendet. Die stimulationsbereiten, differenzierten Zellen hingegen wurden für die weitere Verarbeitung mausweise aus den Kultur-Schalen in sterilen Zentrifugen-Röhrchen gepoolt. Um vor allem auch die adhärenenten Zellen zu gewinnen, wurden diese dafür zunächst vorsichtig mithilfe eines sterilen Zellschabers vom Boden der Petri-Schalen abgelöst. Anschließend konnte das Medium mit den enthaltenen Zellen in die Zentrifugenröhrchen überführt werden. Nach Zentrifugation bei 400 g für 5 min wurde der Überstand verworfen und die verbliebenen Zellpellets einer Maus in insgesamt 10 ml DC-Medium resuspendiert. Zur Quantifizierung der so entstandenen Zellsuspensionen wurden die Zellen in einer 1:10-Verdünnung mit Trypan-Blau wie bereits beschrieben gezählt (s. Kapitel 2.2.4.1). Abhängig von vorhandener Zellzahl und geplantem Experiment wurden schließlich  $2 \cdot 10^6$  Zellen pro Well in 6-Well-Zellkultur-Platten in je 2 ml DC-Medium bzw.  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro Well in 12-Well-Zellkultur-Platten in je 1 ml DC-Medium ausgesät. Erfolgte die Stimulation der BMDCs mit Bakterien oder Mikrobiota-Suspensionen, wurde das Medium vor dem Aussäen mit Gentamicin (1 µg/ml) versetzt, um bakterielles Wachstum während der Stimulationszeit zu verhindern. Die in die Well-Platten ausgesäten Zellen wurden bis zur Stimulation für 1 h bei 37 °C inkubiert.

#### **2.2.4.4 Stimulation der BMDCs mit Bakterien**

Um die Bakterien von ihrem Kulturmedium zu trennen, wurden zunächst 20 ml der *E. coli* mpk-Subkultur bzw. 20 ml der *B. vulgatus* mpk-Kultur entnommen und in je ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 4 000 rpm für 5 min wurde das Kulturmedium sorgfältig abgesaugt und das verbliebene Pellet in sterilem DPBS resuspendiert. Die Quantifizierung der Bakteriensuspensionen erfolgte durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ). Eine  $OD_{600} = 1$  entsprach hierbei einer Bakterienkonzentration von  $5 \cdot 10^8$  Bakterien pro Milliliter. Für jedes Versuchstier wurden für diverse Stimulationsdauern je ein Well mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk stimuliert. Ein Well blieb pro Maus und Stimulationsdauer als unstimulierte Kontrolle (*mock*) unbehandelt. Die

Stimulation der BMDCs erfolgte mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von  $MOI = 1$ , sodass den jeweiligen Wells mit BMDCs das Volumen an Bakteriensuspension zugefügt wurde, das eine der Zellzahl im Well äquivalente Zahl von Bakterien enthielt. Nach Zugabe der jeweiligen Volumina an Bakteriensuspension gewährleistete vorsichtiges Schwenken der Well-Platten eine homogene Durchmischung von Stimulationssuspension und Medium mit BMDCs. Bis zum Ende der untersuchten Stimulationsdauern wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert.

#### **2.2.4.5 Stimulation der BMDCs mit murinen Mikrobiota-Suspensionen**

Für die Stimulation wurden die wie in Kapitel 2.2.2 beschriebenen vorbereiteten Mikrobiota-Suspensionen aufgetaut und auf eine Konzentration von 20 mg/ml mit DC-Medium vorverdünnt. Pro Versuchstier wurde je ein Well mit den Mikrobiota-Suspensionen *DYS*, *DYS+TC* und *DYSBV* für verschiedene Zeiträume stimuliert. Dazu wurden den Stimulations-Wells je 5 µl der Mikrobiota-Vorverdünnung zugefügt, sodass eine Endkonzentration von 100 µg/ml resultierte. Diese Zielkonzentration wurde als Erfahrungswert aus früheren Experimenten gewählt. Als Kontrolle (*mock*) blieb ein Well pro Maus und Zeitpunkt unstimuliert. Anschließend wurden die Zellen bis zum Ende der jeweiligen Stimulationszeit bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % inkubiert.

#### **2.2.4.6 Stimulation der BMDCs mit murinen BMDC-Überständen**

Zur Evaluation der Zytokin-Wirkung in Überständen unterschiedlich stimulierter BMDCs auf andere dendritische Zellen wurden die wie in Kapitel 2.2.3 erläutert gewonnenen Überstände-Pools für die Stimulation zunächst schonend auf Eis aufgetaut. Im Rahmen der Stimulation wurden für jedes Versuchstier und jeden Zeitpunkt je zwei Wells mit BMDCs mit den Überständen *mock-ÜS*, *BV-ÜS* und *EC-ÜS* in einer Konzentration von 30 % des Gesamtvolumens im Well stimuliert. Um die Rolle des Zytokins IL-6 genauer untersuchen zu können, wurde je einem der beiden mit Überständen stimulierten Wells anti-IL-6-Antikörper in einer Konzentration von 6 µg/ml zur Neutralisation des im Überstand eventuell enthaltenen IL-6 zugesetzt. Als Positiv-Kontrolle erfolgte pro Maus und Zeitpunkt die Stimulation eines Wells mit rekombinantem IL-6 (rIL-6) in einer Konzentration von 100 ng/ml. Die neutralisierende Wirkung des anti-IL-6-Antikörpers sollte

durch Zugabe von sowohl anti-IL-6-Antikörper als auch rIL-6 in den genannten Konzentrationen in ein Well pro Stimulationsdauer und Versuchstier nachgewiesen werden. Auch blieb ein Well für jede Maus und jede Stimulationszeit durch Zugabe von DC-Medium ohne Zusatz unstimuliert. Nach erfolgter Applikation aller Stimulanzen wurden die Zellen bis zum Ende der jeweiligen Stimulationszeit bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % inkubiert.

### **2.2.4.7 Stimulationsende**

Nach Ende der untersuchten Stimulationsdauer wurden die stimulierten Zellen mithilfe eines Zellschabers vom Boden der einzelnen Wells abgelöst und zusammen mit dem im Well enthaltenen Medium einzeln in Reaktionsgefäße überführt. Wurden 6-Well-Platten zur Stimulation verwendet, konnte der Inhalt eines Wells zur späteren Durchführung von sowohl RNA- als auch FACS-Analyse zu gleichen Teilen auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt werden. Um Medium und Zellen voneinander zu trennen, wurden die Reaktionsgefäße für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Während der Überstand nach 16 h-Stimulation für spätere Zytokin-Analysen abgenommen und bei -20 °C gelagert wurde, konnte das Medium bei den restlichen Stimulationsdauern verworfen werden. Für RNA-Analysen mit dafür notwendiger RNA-Isolation wurde das verbliebene Zellpellet zur Lyse der Zellen gründlich bis zur Schlierenbildung in 350 µl RLT + 1 % β-Mercaptoethanol resuspendiert. Die so entstandenen Lysate wurden bis zur weiteren Verarbeitung im Rahmen der RNA-Isolation bei -80 °C gelagert. Zur FACS-Analyse der stimulierten Zellen wurden die entsprechenden Pellets in je 100 µl Fc-Block resuspendiert, für die weiteren Fixierungs- und Färbungsschritte (s. Kapitel 2.2.7) einzeln in die Wells einer 96-Well-Platte überführt und für 15 min bei 4 °C in Fc-Block inkubiert.

## **2.2.5 Zellkultur mit murinen intestinalen Epithelzellen**

### **2.2.5.1 Kultivierung der mIC<sub>cl2</sub>-Zellen**

Die Zellkultur mit murinen intestinalen Epithelzellen erfolgte mit Zellen der Zelllinie mIC<sub>cl2</sub>. Zu Beginn der Kultivierung wurde ein kryokonserviertes Aliquot von mIC<sub>cl2</sub>-Zellen der Passagier-Nummer p51 rasch im Wasserbad aufgetaut und danach in eine sterile Zellkulturflasche mit 12 ml auf 37 °C vorgewärmtem mIC-Medium überführt. Die Inkubation der Epithelzell-Kultur erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %. Während der Kultivierung erfolgte regelmäßig ein Austausch des Zellkultur-Mediums gegen frisches mIC-Medium. Der richtige Zeitpunkt, um die vorhandene Zellkultur in neue Zellkulturflaschen zu splitten, ergab sich aus dem mikroskopisch feststellbaren Anteil an konfluenten Zellen. War dieser ausreichend hoch, wurde zum Splitten der Kultur zunächst das Zellkultur-Medium aus der jeweiligen Zellkulturflasche abgesaugt, die Flasche kurz mit 2 ml vorgewärmtem Trypsin-EDTA gespült und anschließend nach Zugabe von 2 ml frischem Trypsin-EDTA bei 37 °C bis zur Ablösung der adhären Zellen vom Flaschenboden inkubiert. Die enzymatische Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von 8 ml mIC-Medium gestoppt und die so erhaltene Zellsuspension je nach Ausgangszelldichte und gewünschter Wachstumsgeschwindigkeit im Verhältnis zwischen 1:3 und 1:8 in neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Diese wurden abschließend mit vorgewärmtem mIC-Medium auf ein Volumen von 12 ml aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung unter den bereits genannten Bedingungen inkubiert.

### **2.2.5.2 Stimulation der mIC<sub>cl2</sub>-Zellen mit Bakterien**

In den Stimulationsversuchen fanden 54-fach, 56-fach und 57-fach passagierte mIC<sub>cl2</sub>-Zellen Verwendung. Vor der Stimulation wurde zur Gewinnung der Zellen das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt, kurz mit 2 ml vorgewärmtem Trypsin-EDTA gewaschen und nach Zugabe von 2 ml frischem Trypsin-EDTA bis zur Ablösung der Zellen bei 37 °C inkubiert. Die so entstandenen Zellsuspensionen der verwendeten Kulturflaschen wurden in einem sterilen Zentrifugenröhrchen gepoolt und für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes konnte das zurückbleibende Zell-Pellet in 10 ml mIC-Medium ohne Zusatz von Antibiotika resuspendiert werden. Die

Bestimmung der Konzentration an vitalen Zellen erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer analog zur Zellzahlbestimmung bei Versuchen mit dendritischen Zellen (s. Kapitel 2.2.4.1). Schließlich wurden je nach experimentellem Design in oberflächenbehandelten 24-Well-Platten (Greiner Bio-One)  $1 \cdot 10^5$  Zellen pro Well in je 1 ml mIC-Medium ohne Antibiotika-Zusatz bzw. in 6-Well-Platten (Greiner Bio-One)  $5 \cdot 10^5$  Zellen pro Well in je 2 ml mIC-Medium ohne Antibiotika-Zusatz ausgesät und bis zur Stimulation 24 h bei 37 °C inkubiert.

Die Kultivierung und Vorbereitung der zur Stimulation verwendeten Bakterienstämme *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk erfolgte analog zur Vorgehensweise bei der Stimulation von BMDCs (s. Kapitel 2.2.4.4). Zur Stimulation mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk wurden die in die jeweiligen Wells zugegebenen Volumina an Bakteriensuspension so gewählt, dass eine  $MOI = 10$  resultierte. Pro Stimulus und Zeitpunkt wurden vier bis fünf technische Replikate stimuliert, ebenso blieben je vier bis fünf technische Replikate als Kontroll-Wells (*mock*) unstimuliert. Nach Zugabe der Bakteriensuspensionen wurden die Zellkulturplatten bis zum Ende der jeweiligen Stimulationsdauern bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % inkubiert. 45 min nach Stimulationsbeginn beendete die Zugabe von Gentamicin (1 µg/ml) bakterielles Wachstum.

### 2.2.5.3 Stimulationsende

Um die mIC<sub>cl2</sub>-Zellen als adhärente Zelllinie beim Ablösen aus den Stimulationswells nicht zu stark für eine spätere FACS-Analyse zu schädigen, erfolgte dies nach Ende der gewünschten Stimulationsdauer durch schonendes Detachment mittels Trypsin-EDTA. Dafür wurde zunächst das noch in den Wells vorhandene Medium abgesaugt und verworfen bzw. bei 16 h stimulierten Wells für spätere Zytokin-Analysen bei -20 °C aufbewahrt. Um verbliebenes FCS aus den Wells zu entfernen und damit ein vorzeitiges Stoppen der Trypsin-Aktivität zu verhindern, wurde zunächst mit 500 µl auf 37 °C vorgewärmtem DPBS gespült. Durch folgende Zugabe von 400 µl Trypsin-EDTA und Inkubation bei 37 °C konnten die Zellen vom Boden der Stimulationswells abgelöst werden. Nach Unterbindung der Trypsin-Aktivität mithilfe des dreifachen Volumens an DPBS mit 1 % FCS (DPBS/FCS) und vorsichtigem Abspülen der Zellen wurde der gesamte Inhalt eines Wells in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei

600 g zentrifugiert. Nach Ende der Zentrifugation konnte der Überstand verworfen und das zurückbleibende Zell-Pellet für die spätere RNA-Analyse gründlich in 350 µl RLT + 1 % β-Mercaptoethanol resuspendiert und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert werden. Proben, die im Verlauf mittels FACS analysiert werden sollten, wurden hier stattdessen in 100 µl Fc-Block resuspendiert und für 15 min bei 4 °C inkubiert.

## **2.2.6 T-Zell-Polarisations-Assay**

### **2.2.6.1 Isolation der T-Zellen**

Die Isolation der naiven T-Zellen erfolgte am Tag der Stimulation aus den Milzen von Wildtyp-Mäusen. Die verwendeten Versuchstiere wurden durch Begasung mit CO<sub>2</sub> und anschließende zervikale Dislokation getötet und mithilfe von Kanülen an den Extremitäten fixiert. Nach gründlicher Desinfektion des Fells wurde die Haut am Bauch inzidiert und der Schnitt nach kranial erweitert. Nach Eröffnung des Peritoneums wurde die Milz im linken Oberbauch aufgesucht, stumpf präpariert und von anhängendem Fettgewebe befreit. Die so gewonnenen Milzen wurden mausweise in vorbereitete Zentrifugenröhrchen mit eiskaltem PBS mit 1 % FCS (PBS/FCS) gegeben und auf Eis gelagert. Die sich an die Präparation anschließenden Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Sowohl Proben als auch verwendete Reagenzien wurden auf Eis gekühlt gehalten. Um die Zellen aus den Milzen zu extrahieren, wurden diese auf je ein sterilisiertes Sieb gegeben. Nach Eröffnung der Milzkapsel wurde das Organ mithilfe eines sterilen Spritzen-Stempels durch das Sieb in eine Petrischale passiert. Die dadurch entstandene Suspension wurde zur Entfernung nichtzellulärer Bestandteile im Anschluss durch einen Zellfilter (100 µm) gegeben und in einem sterilen Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Um in der Suspension enthaltene Erythrozyten zu eliminieren, wurde nach Zentrifugation für 5 min bei 550 g der Überstand abgesaugt und das Zellpellet vorsichtig in 4 ml Erythrozyten-Lysepuffer (ELP) resuspendiert. Nach 7 min Inkubation mit gleichmäßigem Durchmischen der Suspension bei Raumtemperatur wurden 16 ml eiskaltes PBS/FCS hinzugefügt und diese Suspension erneut durch einen Zellfilter (100 µm) in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Auffüllen mit

PBS/FCS auf ein Volumen von 50 ml und Zentrifugation für 5 min bei 550 g, konnte der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml PBS/FCS resuspendiert werden. Die Bestimmung der Zahl vitaler Zellen innerhalb dieser Suspension erfolgte wie bereits beschrieben unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer (s. Kapitel 2.2.4.1). Es schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt mit Absaugen des Überstandes an, um für eine definierte Zell-Konzentration in den nächsten Schritten das Zellpellet in 40  $\mu$ l PBS/FCS pro  $1 \cdot 10^7$  Zellen zu resuspendieren. Die nachfolgende Zell-Separation mit dem Ziel, naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Zell-Suspension zu isolieren, erfolgte mithilfe des *MACS Naive CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit Mouse* (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben. Die so isolierten naiven T-Zellen wurden in einem sterilen Zentrifugenröhrchen aufgefangen, für 5 min bei 550 g zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes in 1 ml eiskaltem PBS/FCS resuspendiert. Zur Quantifikation der vitalen naiven T-Zellen nach der Zell-Separation wurde die Zell-Konzentration erneut mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (s. Kapitel 2.2.4.1). Nach erneuter Zentrifugation der Zell-Suspension und Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in auf 37 °C vorgewärmtem T-Zell-Medium auf eine Konzentration von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml resuspendiert.

### **2.2.6.2 Aktivierung und Stimulation der T-Zellen mit murinen BMDC-Überständen**

Zur Vorbereitung von Aktivierung und eigentlicher Stimulation der T-Zellen wurden für eine adäquate Bindung der Antikörper bereits am Tag vor der Zell-Isolation sterile 96-Well-Platten mit anti-CD3 $\epsilon$ -Antikörper behandelt. Hierfür wurde anti-CD3 $\epsilon$ -Antikörper mit sterilem DPBS auf eine Konzentration von 10  $\mu$ g/ml verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden je 100  $\mu$ l in die Wells der 96-Well-Platten pipettiert, als Negativkontrolle blieb ein Well pro Platte unbehandelt und wurde nur mit 100  $\mu$ l DPBS befüllt. Luftdicht verschlossen wurden die Platten bei 4 °C bis zu ihrer Verwendung über Nacht inkubiert.

Nach Beendigung des Isolations- und Separationsprozesses der naiven T-Zellen wurde die anti-CD3 $\epsilon$ -Antikörper-Lösung vorsichtig aus den Wells der 96-Well-Platten entfernt. Um Rückstände der Lösung vollständig zu entfernen, schlossen

sich drei Waschschrte mit je 200 µl sterilem DPBS pro Well an. Schließlich konnten pro Well 100 µl der in T-Zell-Medium resuspendierten naiven T-Zellen gegeben werden ( $2 \cdot 10^5$  T-Zellen pro Well). Zur Stimulation der T-Zellen wurden bei -80 °C gelagerte sterile BMDC-Überstände von unstimulierten (*mock-ÜS*), *B. vulgatus* mpk-stimulierten (*BV-ÜS*) und *E. coli* mpk-stimulierten (*EC-ÜS*) BMDCs aus einem früheren Experiment verwendet. Nachdem diese schonend auf Eis aufgetaut worden waren, wurden den entsprechenden Wells mit T-Zellen je 100 µl der jeweiligen Überstandslösung zugegeben, in unstimulierte Kontroll-Wells (*mock*) wurden hingegen 100 µl DC-Medium appliziert. Der Negativ- und Positiv-Kontrolle für die T-Zell-Aktivierung wurden ebenfalls nur je 100 µl DC-Medium zugesetzt. Pro Stimulus und Zeitpunkt wurden sechs biologische Replikate angelegt. Um die naiven T-Zellen für die Stimulationszeit zu aktivieren, wurde abschließend pro Well anti-CD28-Antikörper für eine finale Konzentration von 2 µg/ml im Well zugegeben. Die so aktivierten und stimulierten T-Zellen konnten schließlich für die Dauer der Stimulationszeit bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % kultiviert werden.

### 2.2.6.3 Stimulationsende

Um in der am Ende des Experiments stehenden Durchflusszytometrie die Zytokin-Expression der stimulierten T-Zellen besser analysieren zu können, wurden die untersuchten Zytokine während der Stimulation intrazellulär angereichert. Dazu wurde den Wells 4 h vor Ende der jeweiligen Stimulationszeit der Monensin-enthaltende Protein-Transport-Inhibitor *GolgiStop* (BD) für eine Verdünnung von 1:1500 zugesetzt. Des Weiteren wurde der Positiv-Kontrolle 4 µl einer 1:10-Verdünnung von *Leucocyte Activation Cocktail* (LAC, BD) zugefügt. Nach Ende der Stimulationszeit wurde der Inhalt der Wells kurz resuspendiert und in die korrespondierenden Wells einer 96-Well-Platte mit V-Boden überführt. Diese wurde anschließend 5 min bei 550 g zentrifugiert, der Überstand abgekippt und die Zell-Pellets in je 100 µl Fc-Block resuspendiert. Nach 15 min Inkubation bei 4 °C erfolgte die weitere Verarbeitung der T-Zellen analog zur Fixierung und FACS-Färbung anderer Zelltypen (s. Kapitel 2.2.7).

## 2.2.7 Analyse der zellulären Protein-Expression (FACS)

### 2.2.7.1 Fixierung und Tot/Lebend-Färbung der Zellen

Um die Zellen für die weitere Verarbeitung zu stabilisieren, folgte auf die Inkubation in Fc-Block die Fixierung der Zellen. Dieser Schritt wurde mit einer Tot/Lebend-Färbung mithilfe von *Fixable Viability Dye* (FVD) 450 oder FVD 780 kombiniert. Die Reaktionsschritte erfolgten lichtgeschützt auf Eis. Während der Fixierungs- und Färbe-Prozess bei Experimenten mit BMDCs und T-Zellen in 96-Well-Platten durchlaufen werden konnte, wurden zur Verarbeitung der labileren mIC<sub>cl2</sub>-Zellen Reaktionsgefäße verwendet, um Zell-Schädigung oder -Verlust zu vermeiden. Die Zentrifugation erfolgte bei einer Temperatur von 4 °C für 5 min mit einer Zentrifugalbeschleunigung von 400 g (BMDCs), 550 g (T-Zellen) bzw. 600 g (mIC<sub>cl2</sub>-Zellen).

Nach Inkubation der Zellen für 15 min bei 4 °C in Fc-Block wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand vom Zellpellet abgesaugt. Dieses konnte so in 100 µl DPBS/FCS resuspendiert und gewaschen werden. Für die Tot/Lebend-Färbung wurden die Zellen nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes in 100 µl einer 1:10 000-Verdünnung von FVD in DPBS resuspendiert und für 15 min bei einer Temperatur von 4 °C inkubiert. Um im Anschluss möglichst alles der FVD-Lösung von den Zellen zu entfernen, folgten nach Zentrifugation der Proben und Absaugen des Überstandes zwei Waschschrte mit Resuspension der Zellpellets in je 100 µl DPBS/FCS und anschließender Zentrifugation. Nach Entfernen des DPBS/FCS-Überstandes wurden die Zellen schließlich durch Resuspension in je 100 µl *Cytofix/Cytoperm* fixiert und für die spätere intrazelluläre FACS-Färbung permeabilisiert. Auf die Inkubationszeit von 20 min bei 4 °C schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt an, um die *Cytofix/Cytoperm*-Lösung wieder vom Zellpellet trennen zu können. Dieses wurde abschließend in 100 µl *Perm/Wash*-Lösung resuspendiert. Bis zur Färbung wurden die fixierten Zellen luftdicht abgeschlossen bei 4 °C gelagert.

### 2.2.7.2 Färbung der Zellen

Die eigentliche Färbung der Zielstrukturen mittels Fluorophor-gekoppelter Antikörper erfolgte in möglichst geringem zeitlichem Abstand zur Fixierung der Zellen. Um eventuelle Flüssigkeitsverluste durch Verdunstung während der Lagerzeit auszugleichen, wurden die Proben zunächst zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet erneut in je 100 µl *Perm/Wash* resuspendiert. Die in der Färbung verwendeten Antikörper wurden in einem Mastermix gemischt. Hierbei wurden pro Zell-Probe, die gefärbt werden sollte, 50 µl *Perm/Wash*, 1 µl Antikörper für intrazelluläre Proteine und 0,5 µl Antikörper für Oberflächen-Proteine eingesetzt. Wegen der erfahrungsgemäß nur mäßigen Bindungseigenschaften des MCPIP1-Antikörpers wurden hier 1,5 µl Antikörper-Lösung pro zu färbende Probe im Mastermix eingesetzt. Zu jeder Zell-Probe wurden 50 µl des jeweiligen Mastermix zugefügt, gut resuspendiert und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die nun gefärbten Zellen durch Zentrifugation von der Färbelösung getrennt, mit je 100 µl DPBS/FCS gewaschen und schließlich nach erneuter Zentrifugation und Absaugen des Überstandes in je 100 µl DPBS/FCS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Diese wurden bis zur zeitnahen Messung luftdicht verschlossen bei einer Temperatur von 4 °C gelagert.

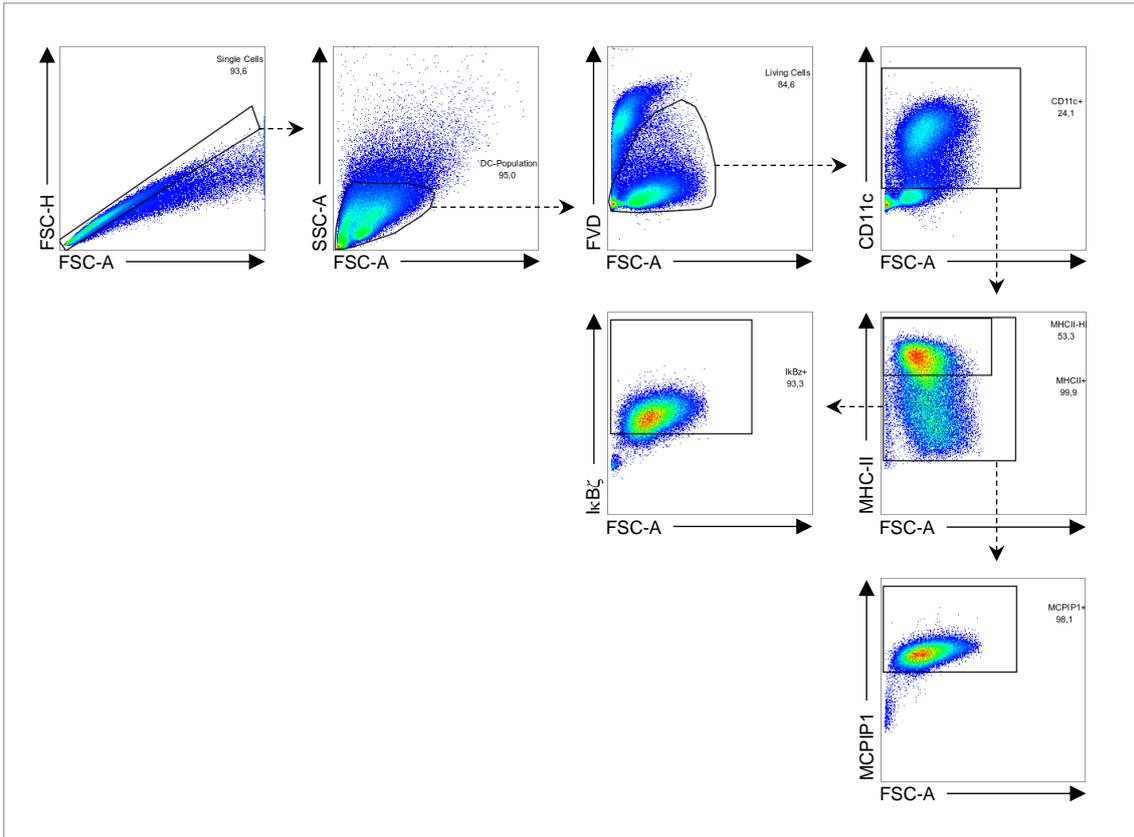
Zur Herstellung von Kontrollen zur Anpassung der Messparameter des FACS-Gerätes wurden vor Beginn des Färbeprozesses aus einigen Proben Zellen entnommen, gepoolt und auf Reaktionsgefäße verteilt. Während ein Teil dieser Kontroll-Proben mit nur einem der verwendeten Antikörper gefärbt wurde (Einzelfärbung), erfolgte bei dem anderen Teil die Zugabe aller in der Färbung enthaltenen Antikörper bis auf einen (*Fluorescence Minus One* (FMO)-Färbung). So konnten neben einer Kontroll-Probe mit gänzlich ungefärbten Zellen für jeden verwendeten Antikörper eine einzelgefärbte und eine FMO-Kontrolle hergestellt werden. Des Weiteren wurden zur späteren Kompensation des FACS-Gerätes für jedes verwendete Fluorochrom eine Kompensations-Probe mit Antikörperbindenden *Beads* hergestellt. Hierzu wurden in Reaktionsgefäßen je 100 µl DPBS/FCS vorgelegt und dazu je ein Tropfen *Beads* gegeben. Pro Reaktionsgefäß wurden nun 0,5 µl (Oberflächen-Zielprotein), 1 µl (intrazelluläres

Zielprotein) bzw. 1,5 µl (MCPIP1 als Zielprotein) der Antikörper-Lösung gegeben. In einer Probe blieben die *Beads* als Kontrolle ungefärbt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Reaktionsgefäße für 10 min bei 400 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die *Beads*-Pellets konnten schließlich in je 100 µl DPBS/FCS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt werden.

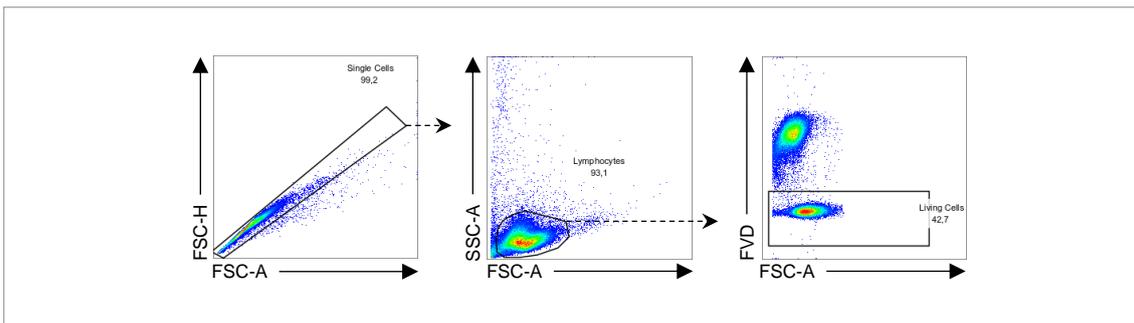
Die Analyse der gefärbten Zell-Proben erfolgte mithilfe eines *LSRFortessa*-Durchflusszytometers (BD).

### **2.2.7.3 Auswertung der FACS-Messung**

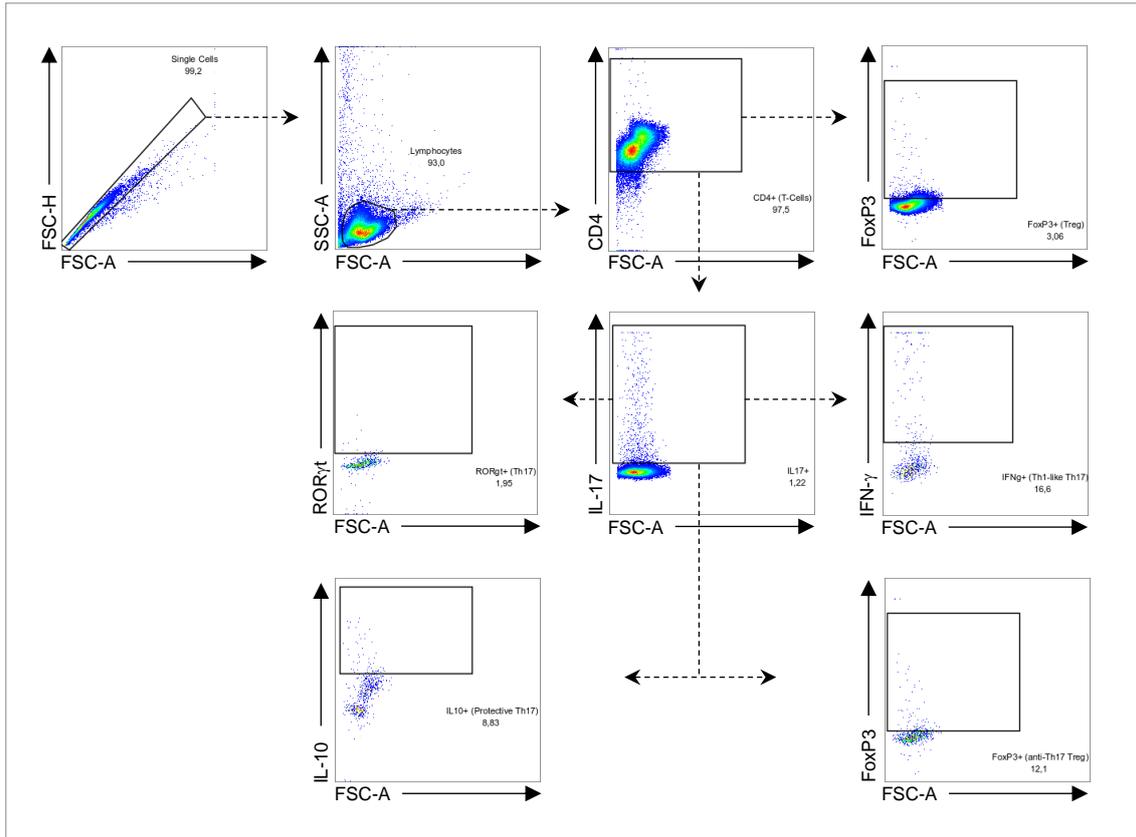
Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mithilfe der Software *FlowJo* (BD). In der Regel wurde für die Analyse auf lebende Einzelzellen gegatet. Die Gates für die Positiv-Populationen eines untersuchten Ziel-Proteins wurden anhand der jeweiligen FMO-Kontrolle gesetzt. Die Gating-Strategien, die zur Analyse der verschiedenen Zell-Typen angewandt wurden, sind exemplarisch Abb. 1 bis Abb. 5 zu entnehmen. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde entweder der Anteil an für das Ziel-Protein positiven Zellen an einer bestimmten Zell-Population oder die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) einer bestimmten Zell-Population für das Ziel-Protein angegeben.



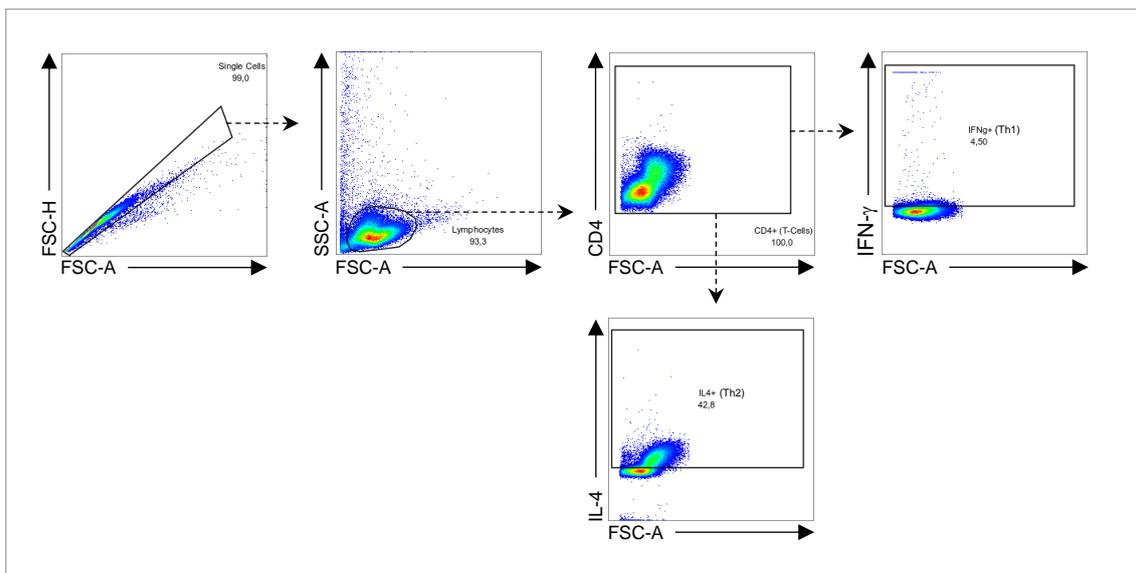
**Abb. 1: Gating von BMDCs.** Nachdem Zelldoubletten oder -aggregate durch Gating auf Einzelzellen mittels *Forward Scatter* (FSC) -A und -H und sonstige Störfaktoren durch Gating auf die DC-Population über FSC und *Side Scatter* (SSC) von der Analyse ausgeschlossen worden waren, wurde mithilfe der Tot/Lebend-Färbung (FVD) auf lebende Zellen gegatet. CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup> DCs wurden schließlich hinsichtlich ihrer MCP1P1- und IκBζ-Fluoreszenz analysiert.



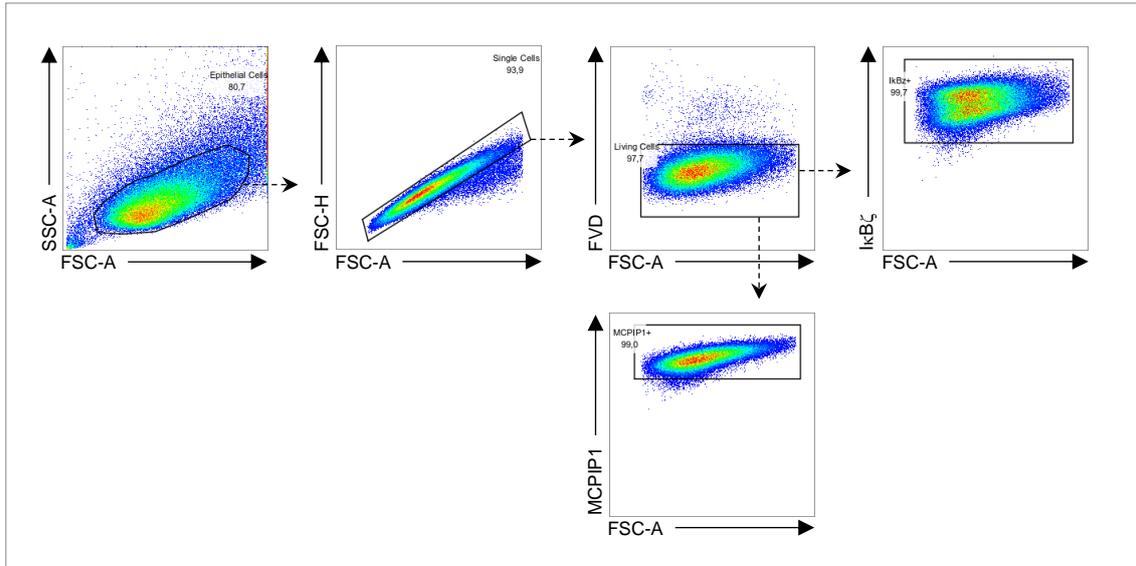
**Abb. 2: Gating zur Ermittlung des Anteils lebender T-Zellen.** Nach Ausschluss von Zell-Aggregaten und Zelldebris mittels *Forward* und *Side Scatter* (FSC, SSC) wurde der Anteil lebender T-Zellen über eine Tot/Lebend-Färbung (FVD) bestimmt.



**Abb. 3: Gating zur Analyse der T<sub>H</sub>-Subgruppen I.** Nach Gating auf einzelne Lymphozyten über *Forward* und *Side Scatter* (FSC, SSC) wurden unter Verzicht auf eine Tot/Lebend-Färbung T<sub>reg</sub>-Zellen als CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-Zellen analysiert. CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>-Zellen wurden hinsichtlich ihrer Expression von RORγt (T<sub>H</sub>17), IFN-γ (T<sub>H</sub>1-like T<sub>H</sub>17), IL-10 (protektive T<sub>H</sub>17) und FoxP3 (anti-T<sub>H</sub>17 T<sub>reg</sub>) untersucht.



**Abb. 4: Gating zur Analyse der T<sub>H</sub>-Subgruppen II.** Nach Gating auf einzelne Lymphozyten über *Forward* und *Side Scatter* (FSC, SSC) wurden CD4<sup>+</sup>-Zellen unter Verzicht auf eine Tot/Lebend-Färbung bezüglich ihrer Expression von IL-4 (T<sub>H</sub>2) und IFN-γ (T<sub>H</sub>1) analysiert.



**Abb. 5: Gating von mIC<sub>12</sub>-Zellen.** Nach Ausschluss von Zelldebris, Zelldoubletten und sonstigen Störfaktoren von der Analyse mittels Gating auf die Epithelzellpopulation und Einzelzellen über *Forward* und *Side Scatter* (FSC, SSC) wurden tote Epithelzellen mithilfe einer Tot/Lebend-Färbung (FVD) von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Die lebenden Einzel-Epithelzellen wurden schließlich auf ihre MCPIP1- und IκBζ-Fluoreszenz hin untersucht.

## 2.2.8 Analyse der zellulären Gen-Expression (qPCR)

### 2.2.8.1 RNA-Isolation

Die Isolierung der zellulären RNA erfolgte aus den in RLT + 1 % β-Mercaptoethanol lysierten Zellen mithilfe des *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die erhaltenen Lösungen isolierter RNA in nucleasefreiem Wasser wurden anschließend mithilfe des *Nanodrop One* (Thermo Fisher) quantifiziert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die isolierten RNA-Proben kurzzeitig bei -20 °C oder längerfristig bei -80 °C gelagert.

### 2.2.8.2 DNase-Verdau

Um Reste genomischer DNA aus den isolierten RNA-Proben zu entfernen, wurden die Proben mithilfe des *DNA-free DNase Kit* (Invitrogen) nach Herstellerangaben weiter aufgereinigt. Für den DNase-Verdau wurden jeweils 5 µg RNA eingesetzt. War dies aufgrund einer zu geringen RNA-Konzentration in der isolierten Probe nicht möglich, wurde die gesamte RNA-Lösung eingesetzt und im Überschuss mit DNase verdaut. Die aufgereinigten RNA-Proben wurden anschließend bei -80 °C bis -20 °C gelagert.

### 2.2.8.3 Quantitative Real-Time PCR

Als Methode zur Quantifizierung der zellulären Genexpression wurde das Verfahren der quantitativen Real-Time PCR (qPCR) mithilfe des *QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit* (Qiagen) angewandt. Die qPCR wurde mit den isolierten und DNase-verdauten RNA-Proben durchgeführt. Alle vorbereitenden Schritte erfolgten unter RNase-freien Bedingungen auf Eis. Gemessen wurden neben den Zielgenen für MCP1P1 und I $\kappa$ B $\zeta$  auch  $\beta$ -Aktin als Housekeeping-Gen (Primersequenzen s. Kapitel 2.1.8). Die Primer wurden in einer Konzentration von 100 pmol/l eingesetzt. Während  $\beta$ -Aktin in 1:10 mit nucleasefreiem Wasser verdünnten RNA-Proben gemessen wurde, erfolgte die qPCR von MCP1P1 und I $\kappa$ B $\zeta$  aus den unverdünnten RNA-Proben. Um die Replikations-Effizienz ermitteln zu können, wurde bei jeder qPCR zunächst ein Standardpool aus verwendeten RNA-Proben mit erwarteter hoher Genexpression erstellt. Dieser wurde anschließend mit nucleasefreiem Wasser zu einer Standardreihe der Konzentrationen 1, 1:5, 1:25 und 1:125 verdünnt, die für jedes untersuchte Gen gemessen wurde. Zum Ausschluss von Verunreinigungen oder unspezifischer Replikation wurde stets RNA-freies nucleasefreies Wasser als Negativkontrolle für jedes Gen gemessen.

Zur Vorbereitung der qPCR wurden zunächst 1  $\mu$ l der isolierten und verdauten RNA-Proben (für  $\beta$ -Aktin: 1:10-Verdünnung der Proben) bzw. der Verdünnungsstufen der Standardreihe einzeln in die Wells einer gekühlten 96-Well-Platte gegeben. Für jedes untersuchte Gen wurde ein Mastermix der benötigten Reagenzien hergestellt. Pro gemessenem Well mit Probe setzte sich dieser aus 5  $\mu$ l *Sybr-Green Mix*, 3,7  $\mu$ l nucleasefreiem Wasser, 0,1  $\mu$ l Forward-Primer, 0,1  $\mu$ l Reverse-Primer und 0,1  $\mu$ l Reverser Transkriptase zusammen. In jedes Well wurden 9  $\mu$ l des entsprechenden Mastermixes zugefügt und durch einmalige Resuspension mit der enthaltenen Probe vermischt. Vor der Messung wurde die 96-Well-Platte mit Schutzfolie verschlossen und für 1 min bei 1 000 g zentrifugiert. Die eigentliche qPCR erfolgte mithilfe eines *LightCycler 480* (Roche) mit dem in Tab. 10 dargestellten Programm.

Tab. 10: Reaktionsprogramm der quantitativen Real Time-PCR (qPCR)

qPCR-Schritt	Temperatur	Dauer
Reverse Transkription	50 °C	10 min
Initiale Aktivierung der PCR	95 °C	5 min
PCR:		40 Zyklen:
Denaturierung	95 °C	10 s
Annealing/Extension	60 °C	30 s
Schmelzkurven-Analyse:		
Denaturierung	95 °C	5 s
Kühlung	46 °C	1 s
Schmelzen	95 °C	0,06 °C/s

#### 2.2.8.4 Auswertung der qPCR

Die Auswertung der qPCR-Daten erfolgte mithilfe der *LightCycler 480 Software* (Roche). Die Qualität des qPCR-Laufs wurde durch Vergleich von sowohl Amplifikationskurven als auch Schmelzkurven der Proben mit der Negativkontrolle und Beurteilung der Standardreihe, mit der die Replikationseffizienz  $E$  der verwendeten Primer-Paare im jeweiligen Durchlauf berechnet wurde, überprüft. Bei starken Abweichungen von der optimalen Replikationseffizienz wurde statt der gemessenen Effizienz die theoretische Replikationseffizienz  $E = 2$  für die weitere Auswertung eingesetzt. Die Quantifizierung der RNA-Expression erfolgte mithilfe der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Hierbei wurde die RNA-Expression des Ziel-Gens in stimulierten Zellen in Relation zur Expression dieses Gens in der nicht stimulierten Kontrolle gesetzt. Um Abweichungen durch unterschiedlich eingesetzte Mengen an RNA in den einzelnen Proben auszugleichen, erfolgte die Normierung der Werte auf die Expression des konstitutiv exprimierten und durch die Stimulation nicht beeinflussten Housekeeping-Gens  $\beta$ -Aktin. Die im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle  $x$ -fach veränderte RNA-Expression  $R$  des untersuchten Ziel-Gens  $Z$  normiert auf das Housekeeping-Gen  $H$  ergab sich unter Verwendung

der Replikationseffizienz  $E$  und der einzelnen Schwellenwertzyklus-Werte  $C_t$  wie folgt:

$$R = \frac{E_Z C_t(\text{unstimuliert})_Z - C_t(\text{stimuliert})_Z}{E_H C_t(\text{unstimuliert})_H - C_t(\text{stimuliert})_H}$$

### 2.2.9 Analyse der zellulären Zytokin-Expression (ELISA)

Zur Quantifizierung der Expression der Zytokine IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  wurden unter Verwendung der *OptEIA*-Kits (BD) *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) der Zellkultur-Überstände von 16 h-stimulierten Zellen nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Bestimmung der Konzentration von IL-23 in Zellkultur-Überständen erfolgte mithilfe des *Quantikine* ELISA-Kits (R&D) nach Hersteller-Angaben. Die Messung der Farbintensität zur Berechnung der Zytokin-Konzentration am Ende der ELISA-Versuche erfolgte mithilfe des ELISA-Readers *Infinite F50* (Tecan) bei Wellenlängen nach Herstellerangaben.

### 2.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe von *GraphPad Prism* (GraphPad Software). Zwei Experimental-Gruppen wurden dabei mithilfe eines ungepaarten t-Tests verglichen, mehrere Gruppen über eine *Analysis of Variance* (ANOVA). Konnte nicht von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden, wurden stattdessen Mann-Whitney- bzw. Kruskal-Wallis-Tests verwendet. In dieser Arbeit sind die Daten als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Statistische Signifikanz ist über  $p$ -Werte wie folgt angegeben: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ und MCPIP1 in dendritischen Zellen

#### 3.1.1 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und MCPIP1-Expression in BMDCs nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk

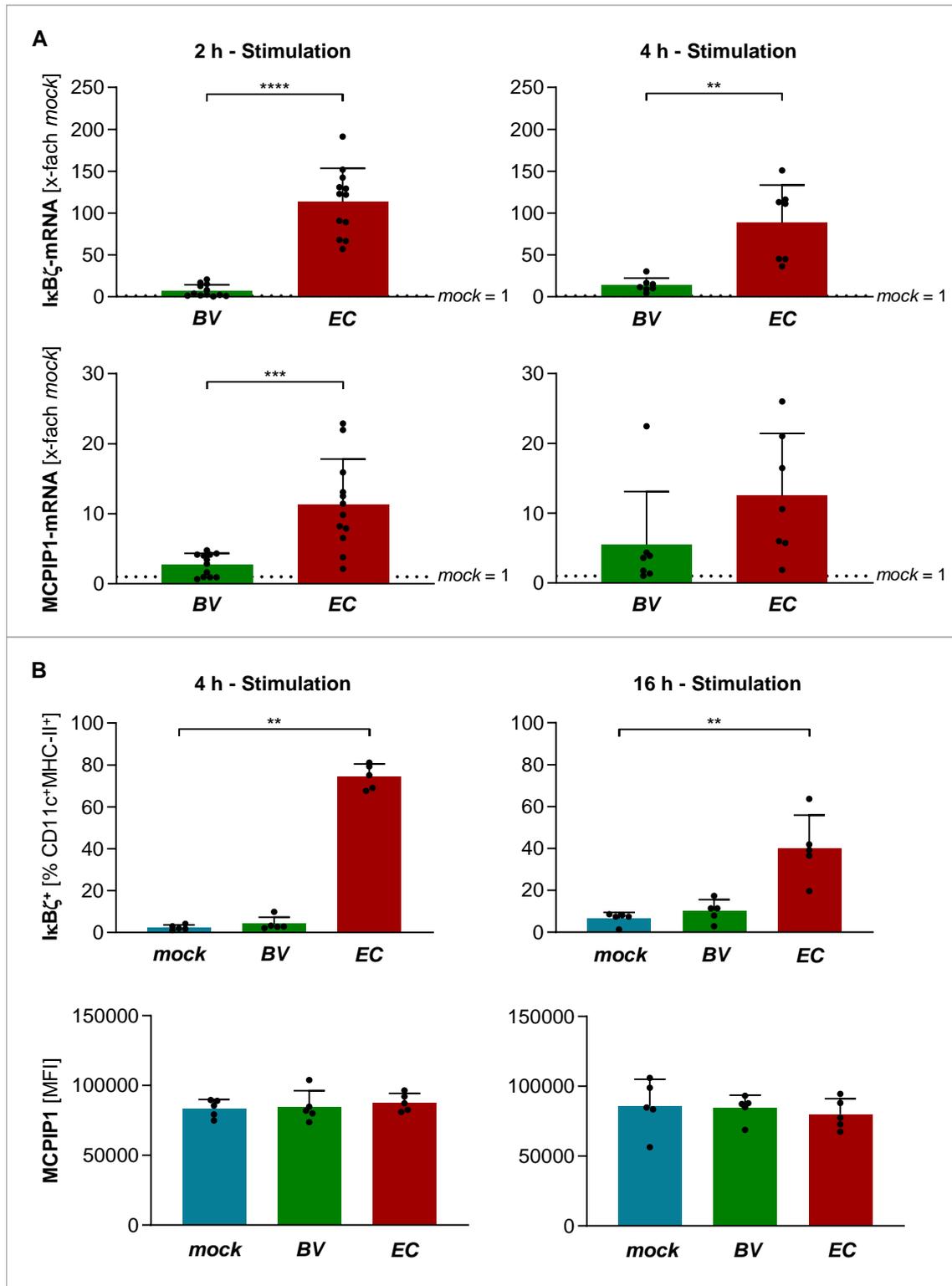
In dieser Studie sollte zunächst untersucht werden, ob die  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und MCPIP1-Expression in dendritischen Zellen durch pathobiontische Kommensalen anders beeinflusst wird als durch symbiontische, um die unterschiedlichen Effekte dieser Mikroorganismen im Rahmen intestinaler Inflammation besser erklären zu können. Dazu wurden wie bereits beschrieben BMDCs aus dem Knochenmark von Wildtyp-Mäusen generiert und für eine Dauer von 2 h, 4 h oder 16 h mit den Modell-Kommensalen *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk bei einer  $\text{MOI} = 1$  stimuliert oder blieben als Kontrolle unstimuliert (*mock*). Anschließend wurde die mRNA-Expression der untersuchten Proteine mittels qPCR, die Protein-Expression mithilfe von Durchflusszytometrie (FACS) der stimulierten Zellen analysiert.

Die Stimulation mit *E. coli* mpk führte bereits nach einer Stimulationszeit von 2 h zu einem deutlichen Anstieg des  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -mRNA-Levels ( $113,5 \pm 40,1$ -fach) im Vergleich zu nicht stimulierten *mock*-Zellen (Abb. 6 A). Im Gegensatz dazu stieg die  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -mRNA bei einer Stimulation mit *B. vulgatus* mpk nur schwach ( $7,3 \pm 7,2$ -fach;  $p^{****}$  vs. *EC*) im Vergleich zu unstimulierten Zellen an. Im zeitlichen Verlauf nach 4 h Stimulation zeigte sich bei *E. coli* mpk-stimulierten Zellen ein leichter Rückgang des  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -mRNA-Levels ( $88,3 \pm 45,2$ -fach), während die Genexpression bei *B. vulgatus* mpk-stimulierten BMDCs leicht anstieg ( $14 \pm 8,3$ -fach;  $p^{**}$  vs. *EC*). Auf Protein-Ebene konnten im Rahmen der FACS-Analyse vergleichbare Ergebnisse beobachtet werden (Abb. 6 B). Während sich der Anteil von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta^+$ -Zellen an  $\text{MHC-II}^+\text{CD11c}^+$ -BMDCs nach 4 h Stimulation mit *B. vulgatus* mpk ( $4,2 \pm 3,2$  %) auf dem Level unstimulierter Zellen ( $2,4 \pm 1,2$  %; *ns* vs. *BV*) bewegte, führte die Exposition gegenüber *E. coli* mpk zu einem

deutlich erhöhten Anteil an  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta^+$ -BMDCs ( $74,4 \pm 6 \%$ ;  $p^{**}$  vs. *mock*). Bei einer längeren Stimulationszeit von 16 h konnte ein Rückgang dieses Wertes auf ungefähr die Hälfte des 4 h-Wertes beobachtet werden ( $40,22 \pm 15,8 \%$ ;  $p^{**}$  vs. *mock*). Die Prozentsätze der *mock*- ( $6,6 \pm 3 \%$ ) und *B. vulgatus* mpk-stimulierten Gruppe ( $10,2 \pm 5,3 \%$ ) stiegen bei 16 h Stimulation hingegen nur leicht an. Auch wenn der Unterschied zwischen *B. vulgatus* mpk- und *E. coli* mpk-stimulierter Gruppe in beiden untersuchten Zeitpunkten recht deutlich ausfiel, ließ sich statistisch keine signifikante Differenz nachweisen.

Auch die Spiegel von MCP1P1-mRNA wurden durch bakterielle Stimulation beeinflusst (Abb. 6 A). So zeigte sich gleichsinnig zur Änderung der  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -mRNA-Level auch hier in 2 h mit *E. coli* mpk stimulierten BMDCs ein signifikant höherer Anstieg ( $11,4 \pm 6,5$ -fach) als in der *B. vulgatus* mpk-stimulierten Gruppe ( $2,7 \pm 1,6$ -fach). Im Zeitverlauf nach 4 h Stimulation veränderten sich diese Werte zwar nur leicht, ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen *B. vulgatus* mpk- ( $5,5 \pm 7,6$ -fach) und *E. coli* mpk-stimulierten Zellen ( $12,5 \pm 8,9$ -fach) konnte jedoch nicht mehr festgestellt werden. Im Kontrast zur deutlich erkennbaren Stimulus-Abhängigkeit der MCP1P1-Expression auf mRNA-Ebene waren sowohl bei 4 h als auch bei 16 h Stimulationszeit auf Protein-Ebene keine Unterschiede zwischen den Stimuli erkennbar (Abb. 6 B). Die MCP1P1-Fluoreszenz der untersuchten Zellen war unabhängig von bakterieller Stimulation auf dem Level der unstimulierten Kontrolle. Die Höhe der MCP1P1-Fluoreszenz änderte sich in den einzelnen Stimulus-Gruppen nicht im untersuchten Zeitverlauf.

Zusammenfassend konnte somit beobachtet werden, dass die Stimulation von BMDCs mit *E. coli* mpk zu einem deutlichen Anstieg der  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und MCP1P1-Expression auf RNA-Ebene, jedoch auf Protein-Ebene nur zu einem Anstieg der  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -Expression im Vergleich zu *B. vulgatus* mpk-stimulierten und unstimulierten Zellen führte. Die MCP1P1-Protein-Expression war unabhängig vom Stimulus und der Stimulationszeit stets vergleichbar mit der von der unstimulierten Kontrolle gezeigten Expression.



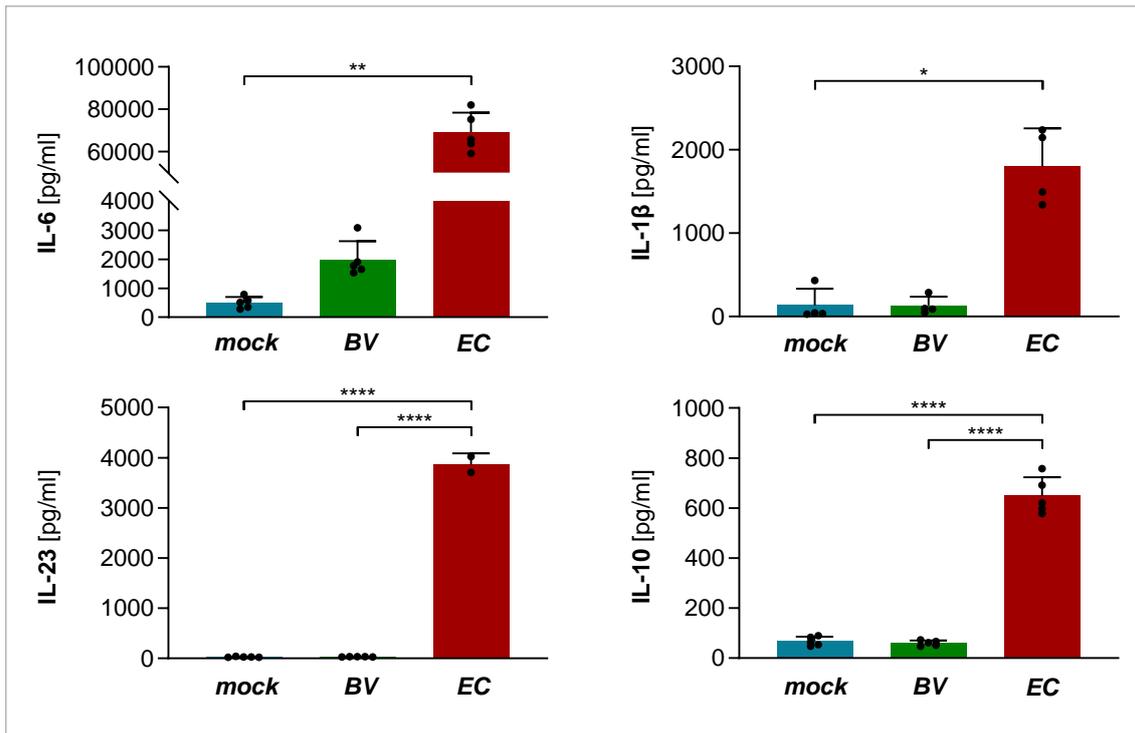
**Abb. 6:  $\kappa B\zeta$ - und MCPIP1-Expression in BMDCs nach Stimulation mit kommensalen Bakterienstämmen.** WT-BMDCs wurden für 2 h, 4 h oder 16 h mit *B. vulgatus* mpk (BV) oder *E. coli* mpk (EC) (MOI = 1) stimuliert, Kontrollen blieben unstimuliert (mock). Die Expression von  $\kappa B\zeta$  und MCPIP1 wurde anschließend auf RNA-Ebene mithilfe von qPCR ( $n = 7-12$ ) (A), auf Protein-Ebene via FACS ( $n = 5$ ) (B) der stimulierten Zellen analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 3.1.2 Zytokin-Sekretion von BMDCs nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk

Zur Analyse von Unterschieden im von bakteriell stimulierten DCs sezernierten Zytokin-Profil mit Blick auf die Zytokin-vermittelte T-Zell-Differenzierung wurden die Überstände von 16 h mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk bei einer  $MOI = 1$  stimulierten BMDCs gewonnen, die enthaltenen Konzentrationen der für die  $T_H17$ -Induktion wichtigen Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$  und IL-23 (Bettelli et al., 2006; Acosta-Rodriguez et al., 2007; Mailer et al., 2015) und des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 mittels ELISA bestimmt und mit den entsprechenden Konzentrationen in Überständen unstimulierter Zellen (*mock*) verglichen.

Die Stimulation von BMDCs mit *E. coli* mpk führte im Vergleich zur Stimulation mit *B. vulgatus* mpk zu einer deutlich, jedoch nicht immer statistisch signifikant erhöhten Sekretion der untersuchten Zytokine (Abb. 7). Dabei zeigten sich hohe Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-6 ( $69172 \pm 9233$  pg/ml), IL-1 $\beta$  ( $1805 \pm 452,3$  pg/ml) und IL-23 ( $3863 \pm 224$  pg/ml) und eine im Vergleich dazu nur geringe Konzentration des antiinflammatorischen IL-10 ( $648,9 \pm 74,4$  pg/ml). Während IL-1 $\beta$  ( $130,7 \pm 107,1$  pg/ml; *ns* vs. *EC*), IL-23 ( $30,7 \pm 3,5$  pg/ml;  $p^{****}$  vs. *EC*) und IL-10 ( $60,2 \pm 10,6$  pg/ml;  $p^{****}$  vs. *EC*) in den Überständen *B. vulgatus* mpk-stimulierter Zellen in vergleichbaren Konzentrationen wie in den jeweiligen unstimulierten Kontrollen nachgewiesen werden konnten, war die Sekretion von IL-6 nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk gesteigert ( $1995 \pm 631,2$  pg/ml; *ns* vs. *EC*) im Vergleich zur *mock*-stimulierten Gruppe ( $500,8 \pm 202$  pg/ml), obgleich dieser Unterschied keine statistische Signifikanz aufwies.

Zusammenfassend ließ sich somit nur nach Stimulation von DCs mit dem Pathobionten *E. coli* mpk eine Induktion der Sekretion proinflammatorischer,  $T_H17$ -induzierender Zytokine, aber auch des antiinflammatorischen IL-10 beobachten.



**Abb. 7: Zytokin-Sekretion von BMDCs nach Stimulation mit kommensalen Bakterienstämmen.** WT-BMDCs wurden für 16 h mit *B. vulgatus* mpk (BV) oder *E. coli* mpk (EC) (MOI = 1) stimuliert, Kontrollen blieben unstimuliert (mock). Anschließend wurden die Zellkultur-Überstände gewonnen und die darin enthaltenen Konzentrationen von IL-6, IL-1β, IL-23 und IL-10 mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung.  $n = 2-5$ . \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 3.1.3 $\kappa B\zeta$ - und MCP1-Expression in BMDCs nach Stimulation mit murinen Mikrobiota-Suspensionen

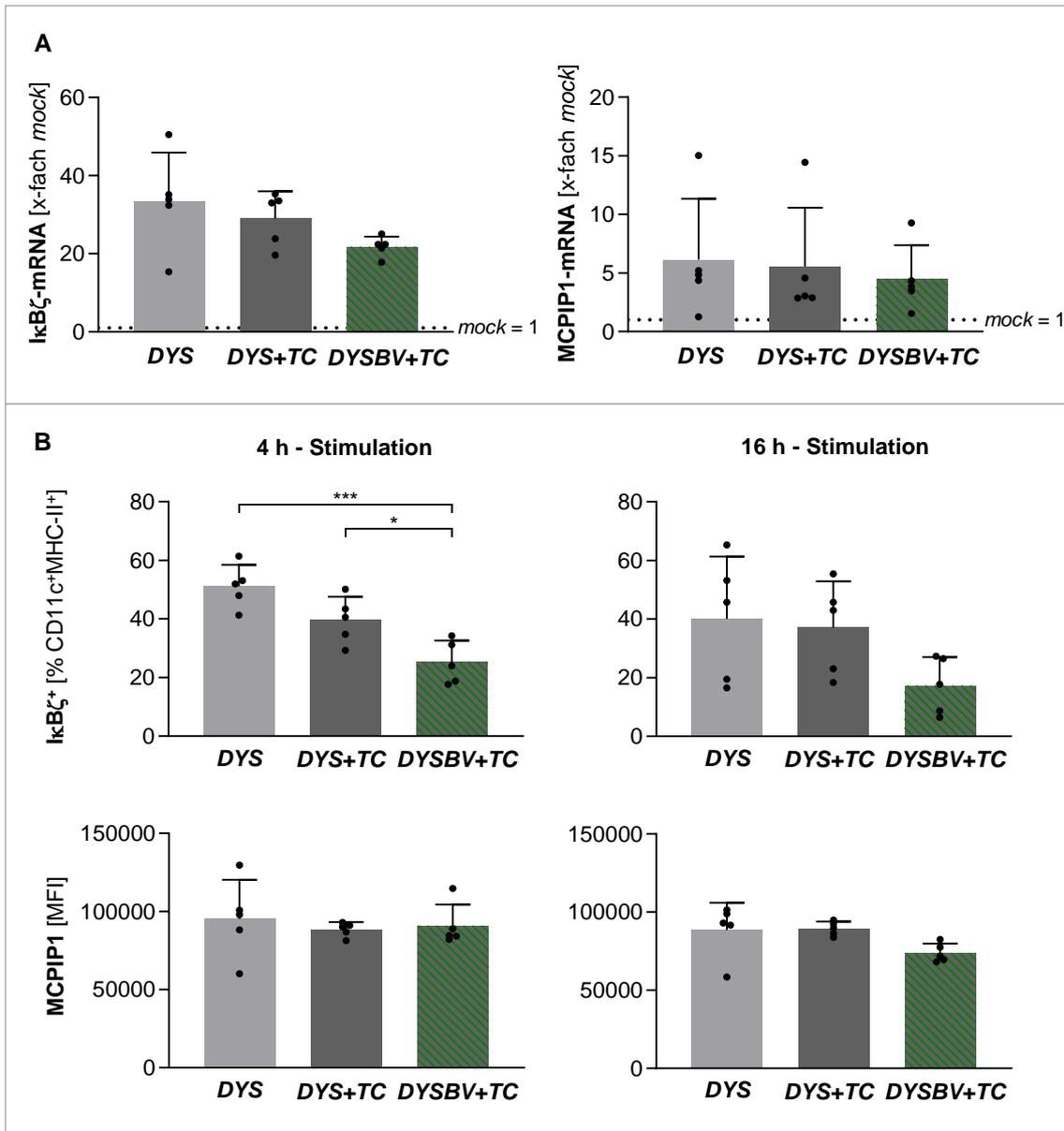
Da DCs *in vivo* nicht mit einzelnen Bakterien-Stämmen, sondern einer komplexen intestinalen Flora konfrontiert werden, sollte im Folgenden der Einfluss verschieden zusammengesetzter intestinaler Mikrobiota auf die Expression von  $\kappa B\zeta$  und MCP1 in DCs *in vitro* untersucht werden. Dafür wurden Wildtyp-BMDCs für eine Stimulationszeit von 2 h, 4 h oder 16 h mit Hitze-inaktivierten Mikrobiota-Suspensionen aus den Faeces von *Rag1*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit dysbiotischem intestinalem Mikrobiom (DYS), *Rag1*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Dysbiose, die an einer T-Zell-Transfer-Colitis litten (DYS+TC), sowie von *Rag1*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit *B. vulgatus* mpk-angereichertem dysbiotischem Mikrobiom und T-Zell-Transfer-Colitis (DYSBV+TC) stimuliert. Anschließend wurde die  $\kappa B\zeta$ - und MCP1-

Expression auf mRNA- und Proteinebene mithilfe von qPCR- bzw. FACS-Analyse quantifiziert.

Bei Stimulation mit allen drei verwendeten Mikrobiota-Suspensionen konnte bereits nach 2 h eine im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen (*mock*) deutliche Erhöhung der  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -mRNA-Spiegel beobachtet werden (Abb. 8 A). Diese war in der *DYSBV+TC*-stimulierten Gruppe tendenziell niedriger ausgeprägt ( $21,8 \pm 2,6$ -fach) als in BMDCs, die mit den Suspensionen *DYS* ( $33,5 \pm 12,5$ -fach) bzw. *DYS+TC* ( $29 \pm 6,9$ -fach) stimuliert worden waren. Nach einer Stimulationszeit von 4 h zeigte sich dieser Unterschied auf Proteinebene deutlich als signifikant geringerer Anteil  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta^+$ -Zellen in der *DYSBV+TC*-stimulierten Gruppe ( $25,2 \pm 7,3$  %) im Vergleich zu den mit *DYS* ( $51,2 \pm 7,3$  %) bzw. *DYS+TC* ( $39,6 \pm 8$  %) stimulierten Proben (Abb. 8 B). Nach 16 h Stimulationszeit war diese Diskrepanz zwischen der *DYSBV+TC*-Gruppe und den beiden anderen Stimuli tendenziell noch immer vorhanden, jedoch statistisch nicht mehr signifikant.

Die Stimulation mit Mikrobiota-Suspensionen für 2 h führte ebenfalls zu einer Erhöhung der MCPIP1-mRNA-Spiegel im Vergleich zu *mock*, wenn auch in geringerem Ausmaß, als dies bei  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -mRNA zu beobachten war (Abb. 8 A). Auch zeigten sich keine relevanten Stimulus-abhängigen Unterschiede in der Höhe der MCPIP1-mRNA. In der FACS-Analyse 4 h stimulierter BMDCs konnte kein Einfluss der Stimulation mit Mikrobiota-Suspensionen auf die MCPIP1-Protein-Expression festgestellt werden (Abb. 8 B). Erst bei einer Stimulationsdauer von 16 h zeigte sich eine leicht verminderte MCPIP1-Fluoreszenz der *DYSBV+TC*-stimulierten BMDCs (MFI  $73935 \pm 5940$ ) im Vergleich zu den mit *DYS* (MFI  $88711 \pm 17351$ ; *ns vs. DYSBV+TC*) und *DYS+TC* (MFI  $89485 \pm 4444$ ; *ns vs. DYSBV+TC*) stimulierten Gruppen.

Insgesamt lässt sich somit festhalten, dass vor allem die Expression von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  in DCs deutlich durch Stimulation mit murinen Mikrobiota-Suspensionen induziert wurde. Hierbei schien ein höherer Anteil an *B. vulgatus* mpk in der Mikrobiota zu einer im Vergleich mit den anderen Mikrobiota-Suspensionen verringerten  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -Expression in den untersuchten Stimulationszeiträumen zu führen.



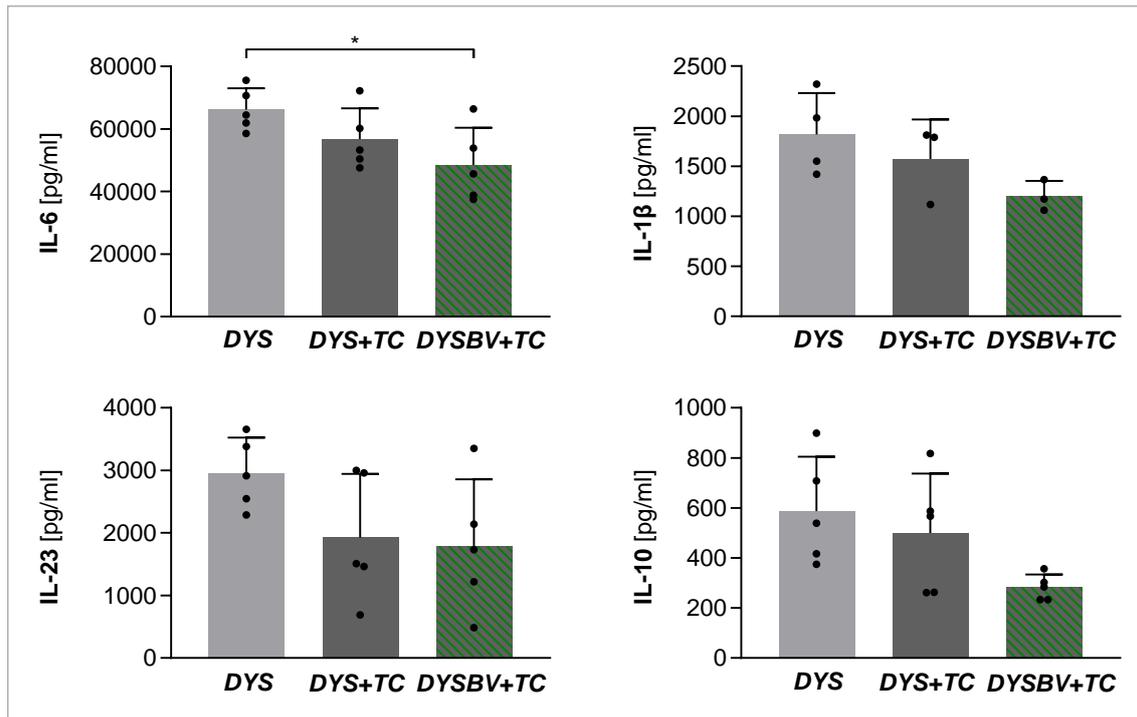
**Abb. 8: IκBζ- und MCP1P1-Expression in BMDCs nach Stimulation mit murinen Mikrobiota-Suspensionen.** WT-BMDCs wurden mit Suspensionen (100 µg/ml) der hitzeinaktivierten Faeces von *Rag1*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit dysbiotischer intestinaler Mikrobiota (*DYS*), *Rag1*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit intestinaler Dysbiose und T-Zell-Transfer-Colitis (*DYS+TC*) oder *Rag1*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit *B. vulgatus* mpk-angereicherter dysbiotischer Mikrobiota mit T-Zell-Transfer-Colitis (*DYSBV+TC*) stimuliert, Kontrollen blieben unstimuliert (*mock*). Die Analyse der IκBζ- und MCP1P1-Expression erfolgte nach 2 h Stimulation auf RNA-Ebene via qPCR (**A**), nach 4 h und 16 h auf Protein-Ebene mithilfe der Durchflusszytometrie (**B**). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. *n* = 5. \**p* < 0,05; \*\*\**p* < 0,001.

### 3.1.4 Zytokin-Sekretion von BMDCs nach Stimulation mit murinen Mikrobiota-Suspensionen

Um auch die Auswirkungen der Mikrobiota-Suspensionen *DYS*, *DYS+TC* und *DYSBV+TC* auf die für die T-Zell-Differenzierung wichtige Zytokin-Sekretion von DCs mit der Zytokin-Sekretion bei Einzelstimulation mit Patho- und Symbionten vergleichen zu können, wurden die Überstände von 16 h mit den genannten Mikrobiota-Suspensionen (100 µg/ml) stimulierten BMDCs via ELISA auf die Konzentrationen der T<sub>H</sub>17-induzierenden Zytokine IL-6, IL-1β und IL-23 (Bettelli et al., 2006; Acosta-Rodriguez et al., 2007; Mailer et al., 2015) und des antiinflammatorischen IL-10 untersucht.

Generell hatte die Stimulation mit Mikrobiota-Suspensionen einen deutlichen Anstieg der Konzentrationen der untersuchten Zytokine (Abb. 9) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (s. Abb. 7) zur Folge. Mit Blick auf den Einfluss der unterschiedlichen Zusammensetzung der Mikrobiota-Suspensionen konnten tendenziell geringere Zytokin-Konzentrationen in den Überständen *DYS+TC*- und besonders *DYSBV+TC*-stimulierter BMDCs gemessen werden, als dies bei *DYS*-stimulierten DCs der Fall war. Die Konzentration an IL-6 war im Überstand der *DYSBV+TC*-stimulierten Gruppe ( $48470 \pm 11964$  pg/ml) im Vergleich zur IL-6-Konzentration der *DYS*-stimulierten Proben ( $66238 \pm 6820$  pg/ml) sogar signifikant geringer. Relativ zur IL-6-Konzentration in *DYS+TC*-stimulierten Proben ( $56727 \pm 9864$  pg/ml) zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Abschließend lässt sich somit eine geringer ausgeprägte Zytokin-Sekretion von DCs bei Stimulation mit *B. vulgatus* mpk-angereicherter Mikrobiota festhalten, sodass übereinstimmend mit den Ergebnissen aus der Zytokin-Analyse der mit *B. vulgatus* mpk allein stimulierten DCs (s. Abb. 7) von einer reduzierten Sekretion T<sub>H</sub>17-induzierender Zytokine bei Anwesenheit des symbiontischen Kommensalen ausgegangen werden kann (Michaelis et al., 2021).



**Abb. 9: Zytokin-Sekretion von BMDCs nach Stimulation mit murinen Mikrobiota-Suspensionen.** *WT*-BMDCs wurden für 16 h mit Suspensionen (100 µg/ml) der hitzeinaktivierten Faeces von *Rag1*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit dysbiotischer intestinaler Mikrobiota (*DYS*), *Rag1*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit intestinaler Dysbiose und T-Zell-Transfer-Colitis (*DYS+TC*) oder *Rag1*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit *B. vulgatus* mpk-angereicherter dysbiotischer Mikrobiota mit T-Zell-Transfer-Colitis (*DYSBV+TC*) stimuliert. Die Zellkultur-Überstände wurden nach Ende der Stimulationszeit gewonnen und die darin enthaltenen Konzentrationen an IL-6, IL-1β, IL-23 und IL-10 mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung.  $n = 3-5$ . \* $p < 0,05$ .

### 3.1.5 TLR-abhängige Expression von $\kappa B\zeta$ und MCP1P1 in BMDCs nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die kommensalen Bakterienstämme *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk einen unterschiedlichen Effekt auf die Expression von  $\kappa B\zeta$  und MCP1P1 in DCs haben, sollte nachfolgend untersucht werden, über welche Signalwege die bakteriellen Stimuli die intrazelluläre Expression der untersuchten Proteine beeinflussen. Da TLRs als PRRs eine entscheidende Rolle in der Phagozytose von Antigenen durch DCs zugeschrieben wird (Akira et al., 2006), sollte ermittelt werden, ob diese Rezeptorgruppe für die kommensal induzierte  $\kappa B\zeta$ - und MCP1P1- Expression relevant ist. Weil TLR2 und TLR4 mit bakteriellen Lipoproteinen (Aliprantis et al.,

1999) bzw. LPS (Chow et al., 1999) wichtige Antigene der Gram-negativen Modell-Kommensalen binden können, wurde der Fokus auf diese Rezeptor-Subtypen gelegt. Zur Analyse der TLR-Funktion wurden BMDCs aus dem Knochenmark von TLR-Knockout-Mäusen der Genotypen *Tlr2*<sup>-/-</sup>, *Tlr4*<sup>-/-</sup> und *Tlr2*<sup>-/-</sup>*xTlr4*<sup>-/-</sup> und von *WT*-Mäusen als Kontrolle generiert und für 0 h, 2 h, 4 h oder 16 h mit *B. vulgatus* mpk oder *E. coli* mpk stimuliert bzw. blieben unstimuliert (*mock*). Nach Ende der jeweiligen Stimulationszeit wurde die I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCP1P1-Expression der BMDCs auf Protein-Ebene mithilfe von FACS untersucht. Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte für die 2 h stimulierten Proben via qPCR.

Während die Stimulation von *WT*-BMDCs mit *E. coli* mpk für 2 h, wie bereits in vorausgehenden Experimenten gezeigt, zu einem deutlichen Anstieg der I $\kappa$ B $\zeta$ -mRNA-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle führte (175,6  $\pm$  70,8-fach), fiel dieser in *Tlr2*<sup>-/-</sup>-BMDCs (101,5  $\pm$  30,3-fach) und *Tlr4*<sup>-/-</sup>-BMDCs (30,6  $\pm$  12,6-fach) signifikant geringer aus (Abb. 10 A). DCs, die weder TLR2 noch TLR4 exprimierten (*Tlr2*<sup>-/-</sup>*xTlr4*<sup>-/-</sup>), zeigten nach Stimulation mit *E. coli* mpk keinen relevanten Anstieg der I $\kappa$ B $\zeta$ -mRNA-Expression (1,6  $\pm$  0,7-fach; *p*<sup>\*\*\*\*</sup> vs. *WT*) im Vergleich zu *mock*-stimulierten Zellen. Bei den mit *B. vulgatus* mpk stimulierten Gruppen zeigte sich hingegen eine generell nur geringe Erhöhung der I $\kappa$ B $\zeta$ -mRNA im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Zwar war auch hier die I $\kappa$ B $\zeta$ -mRNA-Expression in *WT*-BMDCs tendenziell stärker ausgeprägt (4,1  $\pm$  1,6-fach) als in *Tlr2*<sup>-/-</sup>- (1,3  $\pm$  0,2-fach), *Tlr4*<sup>-/-</sup>- (3,3  $\pm$  1,3-fach) und *Tlr2*<sup>-/-</sup>*xTlr4*<sup>-/-</sup>-Zellen (1  $\pm$  0,2-fach), diese Unterschiede wiesen jedoch keine statistische Signifikanz auf. (Michaelis et al., 2021)

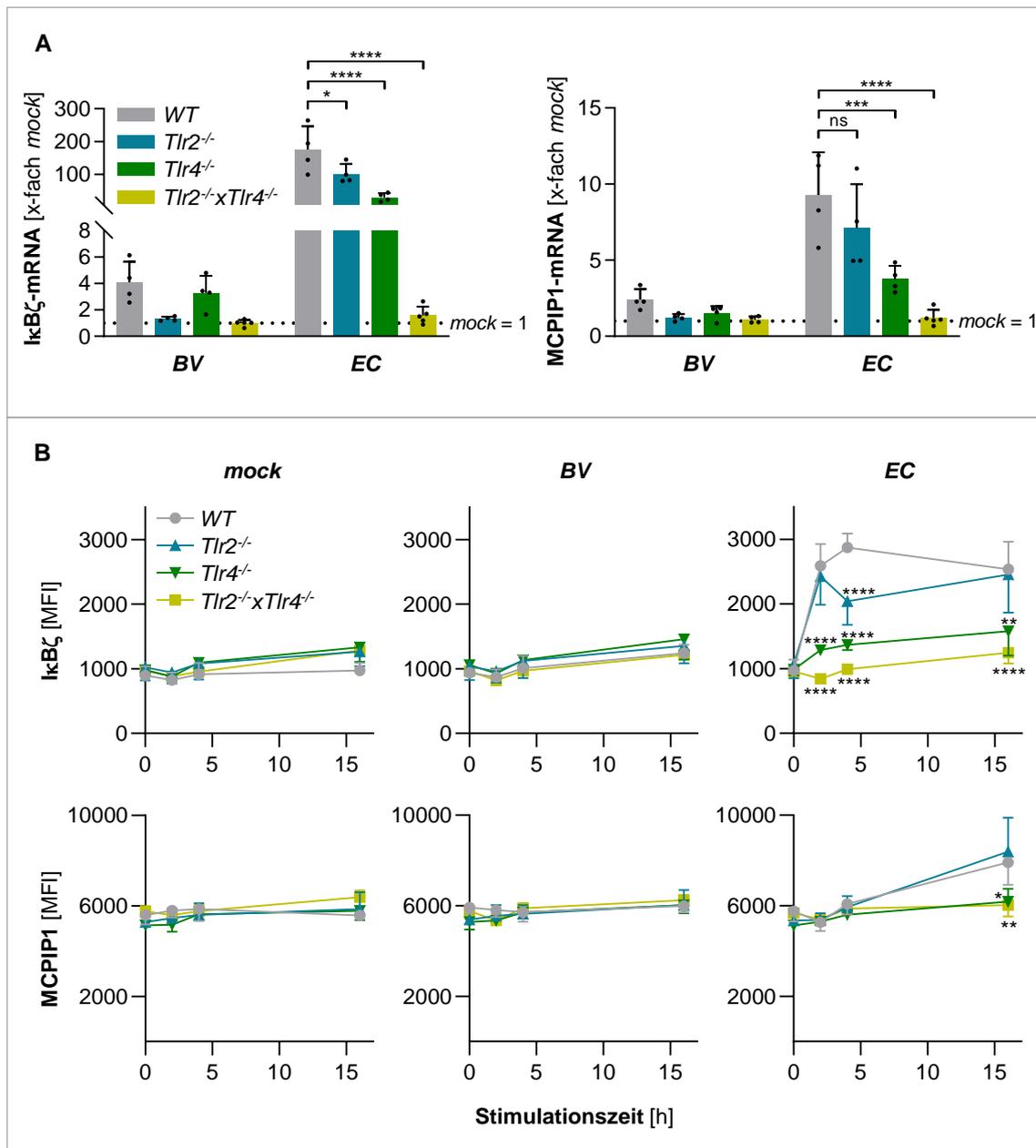
Die MCP1P1-mRNA-Level nach bakterieller Stimulation schienen auf vergleichbare Weise abhängig von TLR-Aktivierung zu sein (Abb. 10 A). So war auch hier in der *E. coli* mpk-stimulierten Gruppe die MCP1P1-mRNA-Expression von *Tlr2*<sup>-/-</sup>-BMDCs leicht (7,1  $\pm$  2,9-fach; *ns* vs. *WT*) und von *Tlr4*<sup>-/-</sup>-BMDCs deutlich (3,8  $\pm$  0,9-fach; *p*<sup>\*\*\*</sup> vs. *WT*) verringert im Vergleich zur *WT*-Gruppe (9,3  $\pm$  2,8-fach). Auch MCP1P1 wurde in *Tlr2*<sup>-/-</sup>*xTlr4*<sup>-/-</sup>-DCs auf RNA-Ebene nach *E. coli* mpk-Stimulation nicht stärker exprimiert als in unstimulierten Zellen (1,2  $\pm$  0,5-fach; *p*<sup>\*\*\*\*</sup> vs. *WT*). Die Stimulation mit *B. vulgatus* mpk führte zwar

insgesamt nur zu einer geringen Induktion der MCP1P1-mRNA-Expression, es konnte jedoch auch in dieser Gruppe ein tendenziell, wenn auch nicht statistisch signifikant, geringerer Anstieg in *Tlr2*<sup>-/-</sup> (1,2 ± 0,2-fach) und *Tlr2*<sup>-/-</sup> × *Tlr4*<sup>-/-</sup>-BMDCs (1,1 ± 0,2-fach) im Vergleich zu *WT*-Zellen (2,4 ± 0,7-fach) beobachtet werden.

Die TLR-abhängigen Unterschiede in der IκBζ-mRNA-Expression konnten weitestgehend auch bei Untersuchung der IκBζ-Protein-Expression bestätigt werden (Abb. 10 B). So führte die Stimulation mit *B. vulgatus* mpk zu keinem relevanten Anstieg der IκBζ-Spiegel im Vergleich zur unstimulierten Gruppe. Auch konnten keine signifikanten TLR-abhängigen Unterschiede in der IκBζ-Expression auf Protein-Ebene festgestellt werden. Anders stellte sich dies in der *E. coli* mpk-stimulierten Gruppe dar. Hier konnte übereinstimmend mit anderen Versuchen (s. Abb. 6) bereits ab einer Stimulationsdauer von 2 h ein deutlicher Anstieg des IκBζ-Proteins in *WT*-BMDCs (MFI 2590 ± 336,3) im Vergleich zu nicht stimulierten *WT*-Zellen (MFI 822,3 ± 119,4) beobachtet werden. Diese Erhöhung des IκBζ-Proteins war in *Tlr4*<sup>-/-</sup>-DCs erheblich verringert (MFI 1285 ± 57,3; *p*<sup>\*\*\*\*</sup> vs. *WT*) und in *Tlr2*<sup>-/-</sup> × *Tlr4*<sup>-/-</sup>-DCs vollständig aufgehoben (MFI 842,2 ± 72,8; *p*<sup>\*\*\*\*</sup> vs. *WT*). Die IκBζ-Protein-Spiegel in *Tlr2*<sup>-/-</sup>-BMDCs waren relativ zu *WT*-Zellen hingegen nur leicht verringert (MFI 2427 ± 439,7; *ns* vs. *WT*). (Michaelis et al., 2021)

Im Vergleich zu IκBζ zeigte sich bei der Analyse der MCP1P1-Protein-Expression ein anderes Bild (Abb. 10 B). Hier ließ sich weder nach 2 h noch nach 4 h Stimulation mit *B. vulgatus* mpk oder *E. coli* mpk eine Veränderung der MCP1P1-Konzentration im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bzw. zu 0 h stimulierten BMDCs erkennen. Auch konnte kein TLR-Status-abhängiger Unterschied in der MCP1P1-Protein-Expression nachgewiesen werden. Erst nach einer Stimulationsdauer von 16 h konnte in *E. coli* mpk-stimulierten *WT*- (MFI 7912 ± 982,1) und *Tlr2*<sup>-/-</sup>-BMDCs (MFI 8392 ± 1497; *ns* vs. *WT*) ein mäßiger Anstieg des MCP1P1-Proteins beobachtet werden. Sowohl in *Tlr4*<sup>-/-</sup>-DCs (MFI 6181 ± 567,8; *p*<sup>\*</sup> vs. *WT*) als auch in *Tlr2*<sup>-/-</sup> × *Tlr4*<sup>-/-</sup>-Zellen (MFI 6030 ± 502,3; *p*<sup>\*\*</sup> vs. *WT*) blieb dieser Anstieg auch nach 16 h *E. coli* mpk-Stimulation aus.

Zusammenfassend deuten diese Beobachtungen auf eine entscheidende Rolle von TLR4 in der bakteriell induzierten  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und MCPIP1-Expression in DCs hin. Zu einem gewissen Teil scheint auch TLR2 in die Signalkaskade eingebunden zu sein. (Michaelis et al., 2021)



**Abb. 10: TLR-abhängige Expression von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  und MCPIP1 in bakteriell stimulierten BMDCs.** BMDCs von WT-Mäusen und der TLR-Knockout-Mäuse *Tlr2*<sup>-/-</sup>, *Tlr4*<sup>-/-</sup> und *Tlr2*<sup>-/-</sup>*xTlr4*<sup>-/-</sup> wurden für 0 h, 2 h, 4 h oder 16 h mit *B. vulgatus* mpk (BV) oder *E. coli* mpk (EC) stimuliert (MOI = 1), Kontrollen blieben unstimuliert (mock). Die  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und MCPIP1-Expression wurde auf RNA-Ebene durch qPCR der 2 h-stimulierten BMDCs untersucht (A), auf Protein-Ebene für alle Zeitpunkte via FACS (B). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. n = 4-5. ns: nicht signifikant; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001 vs. WT. (A & B:  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  modifiziert nach Michaelis et al., 2021)

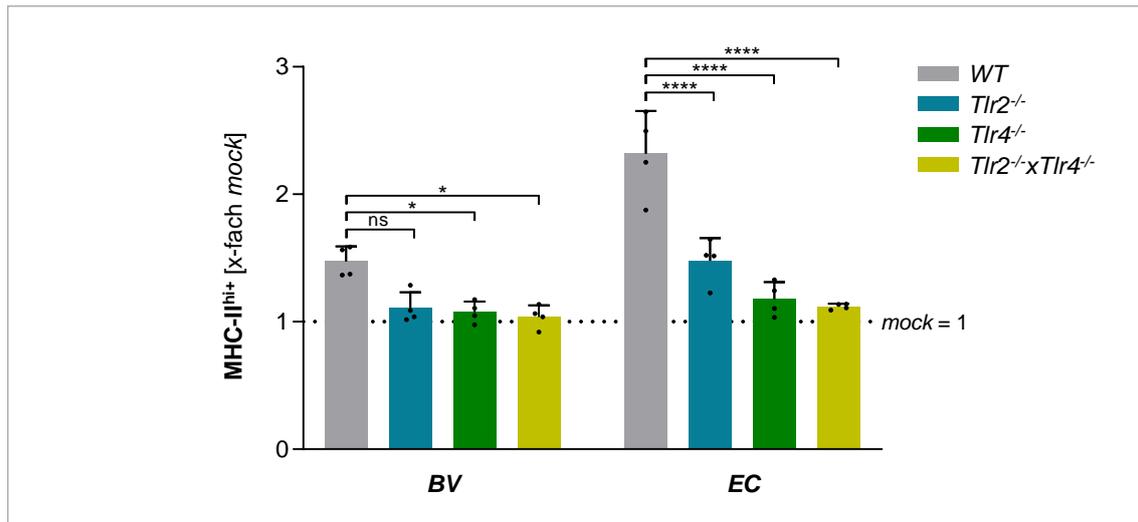
### 3.1.6 TLR-abhängige Maturation von BMDCs nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk

Um die Funktion der unterschiedlichen TLRs bei der Stimulations-induzierten DC-Maturation aufzuklären, wurden die 16 h lang mit *B. vulgatus* mpk, *E. coli* mpk oder nicht stimulierten BMDCs der Genotypen *Tlr2*<sup>-/-</sup>, *Tlr4*<sup>-/-</sup> und *Tlr2*<sup>-/-</sup>*xTlr4*<sup>-/-</sup> und von *WT*-Mäusen mithilfe von FACS auf den Anteil der MHC-II besonders stark exprimierenden DCs (MHC-II<sup>hi+</sup>) untersucht.

Während es nach 16 h Stimulation mit *E. coli* mpk (Abb. 11) in den *WT*-Proben zu einem deutlichen Anstieg des Anteils MHC-II<sup>hi+</sup>-BMDCs im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle des gleichen Genotyps kam ( $2,3 \pm 0,3$ -fach), war dieser in *Tlr2*<sup>-/-</sup>-Proben deutlich vermindert ( $1,5 \pm 0,2$ -fach;  $p^{****}$  vs. *WT*). Bei mit *E. coli* mpk stimulierten *Tlr4*<sup>-/-</sup> ( $1,2 \pm 0,1$ -fach;  $p^{****}$  vs. *WT*) und *Tlr2*<sup>-/-</sup>*xTlr4*<sup>-/-</sup>-BMDCs ( $1,1 \pm 0,02$ -fach;  $p^{****}$  vs. *WT*) konnte hingegen kein Anstieg der MHC-II<sup>hi+</sup>-Zellen beobachtet werden.

Auch in 16 h mit *B. vulgatus* mpk stimulierten *WT*-BMDCs (Abb. 11) stieg der Anteil an Zellen mit MHC-II<sup>hi+</sup>-Phänotyp im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle leicht an ( $1,5 \pm 0,1$ -fach). In den anderen Genotypen zeigte sich dieser Anstieg nicht, sodass auch mit *B. vulgatus* mpk-stimulierte *Tlr4*<sup>-/-</sup> ( $1,1 \pm 0,1$ -fach) und *Tlr2*<sup>-/-</sup>*xTlr4*<sup>-/-</sup>-DCs ( $1,1 \pm 0,1$ -fach) einen signifikant geringeren Anteil MHC-II<sup>hi+</sup>-Zellen als die entsprechend stimulierten *WT*-DCs aufwiesen. Obwohl sich auch der Prozentsatz der MHC-II<sup>hi+</sup>-Zellen in *Tlr2*<sup>-/-</sup>-Zellen nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk kaum vom *mock*-Level abhob ( $1,1 \pm 0,1$ -fach), ließ sich im Vergleich zu *WT*-Zellen keine statistisch signifikante Reduktion feststellen.

Im Überblick scheinen TLRs damit auch eine Funktion vor allem bei der *E. coli* mpk-induzierten DC-Maturation zu haben. So führte die Abwesenheit von TLR2 zu einer vermindert ausgeprägten Maturation der stimulierten DCs. Bei Knockout des TLR4 kam es zu keiner Maturation der BMDCs im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Somit ist auch für die *E. coli* mpk-induzierte DC-Maturation *in vitro* eine entscheidende Rolle des TLR4 anzunehmen.



**Abb. 11: TLR-abhängige Maturation bakteriell stimulierter BMDCs.** BMDCs von *WT*-, *Tlr2*<sup>-/-</sup>, *Tlr4*<sup>-/-</sup> oder *Tlr2*<sup>-/-</sup>*xTlr4*<sup>-/-</sup>-Mäusen, die 16 h mit *B. vulgatus* mpk (*BV*), *E. coli* mpk (*EC*) (*MOI* = 1) oder nicht stimuliert (*mock*) worden waren, wurden mithilfe von FACS auf den Anteil MHC-II<sup>hi+</sup>-Zellen als Marker für die DC-Maturation untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte der auf die unstimulierten Kontrolle normierten MHC-II<sup>hi+</sup>-Anteile mit Standardabweichung. *n* = 4. ns: nicht signifikant; \**p* < 0,05; \*\*\*\**p* < 0,0001.

### 3.1.7 Einfluss von DC-Zytokinen auf I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCP1-Expression in nicht bakteriell stimulierten BMDCs

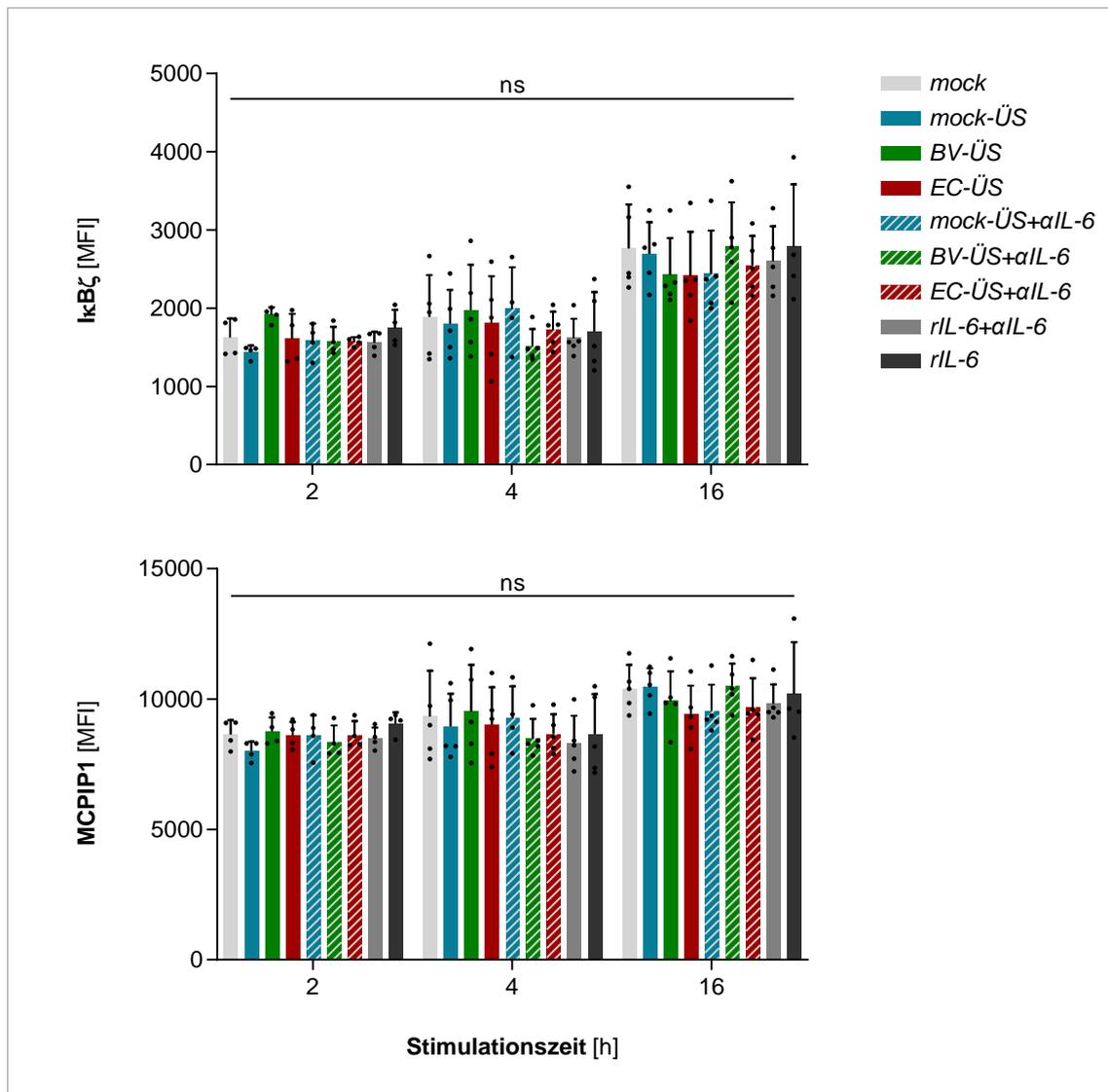
Nachdem in zurückliegenden Studien der Arbeitsgruppe ein positiver autokriner IL-6-Feedback-Loop im Rahmen der *B. vulgatus* mpk-induzierten DC-Semimaturation beschrieben wurde (Frick et al., 2006; Frick et al., 2010), sollte im Folgenden untersucht werden, ob von bakteriell stimulierten DCs sezernierte Zytokine auch die I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCP1-Expression von DCs, die keinem bakteriellen Stimulus ausgesetzt waren, beeinflussen können. Dazu wurden zunächst BMDCs von *WT*-Mäusen generiert und für 16 h bei einer *MOI* = 1 mit *B. vulgatus* mpk, *E. coli* mpk oder nicht (*mock*) stimuliert. Die Überstände der Zell-Kultur wurden gepoolt und, um Kontamination zu vermeiden und verbliebene Bakterien zu entfernen, steril filtriert, sodass die drei Stimulationslösungen *mock*-ÜS, *BV*-ÜS und *EC*-ÜS entstanden. Um TLR-abhängige Effekte von eventuell in den Stimulationslösungen verbliebenen bakteriellen Bestandteilen wie LPS zu vermeiden und ausschließlich den Einfluss der enthaltenen Zytokine untersuchen zu können, wurden BMDCs aus *Tlr2*<sup>-/-</sup>*xTlr4*<sup>-/-</sup>-Mäusen generiert. Diese wurden schließlich für 2 h, 4 h oder 16 h

mit den jeweiligen Überständen (30 % des finalen Volumens) stimuliert. Zur besseren Analyse der IL-6-Wirkung wurden BMDCs darüber hinaus mit den genannten Überständen unter Zugabe eines IL-6-neutralisierenden monoklonalen Antikörpers ( $\alpha$ IL-6; 6  $\mu$ g/ml) stimuliert. Als Kontrolle erfolgte die Stimulation mit rekombinantem Maus-IL-6 (rIL-6; 100 ng/ml), einer Mischung von  $\alpha$ IL-6 und rIL-6 ( $\alpha$ IL-6+rIL-6) und DC-Medium (*mock*). Nach Ende der Stimulationszeit konnte die I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCP1-Protein-Expression mithilfe von FACS analysiert werden.

Um zu überprüfen, ob die verwendeten DC-Überstände Zytokine überhaupt in unterschiedlichem Ausmaß enthielten, erfolgte exemplarisch die Bestimmung der Konzentrationen an IL-6 und TNF- $\alpha$  in den Überständen *mock-ÜS*, *BV-ÜS* und *EC-ÜS* mittels ELISA. Hier zeigte sich sowohl für IL-6 (51659  $\pm$  5001 pg/ml) als auch für TNF- $\alpha$  (4335 pg/ml) eine deutliche Erhöhung der Zytokin-Konzentrationen im Überstand von *E. coli* mpk-stimulierten BMDCs. Im Gegensatz dazu war in *BV-ÜS* die Konzentration an IL-6 (4121  $\pm$  12 pg/ml) und TNF- $\alpha$  (43,44 pg/ml) nur leicht erhöht im Vergleich zur Konzentration in *mock-ÜS* (IL-6: 244,5  $\pm$  64,7 pg/ml bzw. TNF- $\alpha$ : 25 pg/ml). Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.1.2 konnten somit unterschiedliche Zytokin-Profile der Stimulations-Überstände angenommen werden.

Im Rahmen der FACS-Analyse zeigten sich in der I $\kappa$ B $\zeta$ -Protein-Expression über alle untersuchten Zeitpunkte hinweg keine relevanten Stimulus-abhängigen Unterschiede (Abb. 12). Die I $\kappa$ B $\zeta$ -Konzentration bewegte sich stets auf dem Level der nicht stimulierten Kontrolle (*mock*) des jeweiligen Zeitpunkts. Insgesamt konnte im Zeitverlauf ein leichter Anstieg der I $\kappa$ B $\zeta$ -Protein-Spiegel beobachtet werden. Dieser war jedoch nicht Stimulus-, sondern Zeit-abhängig.

Auch die MCP1-Protein-Expression der BMDCs schien nicht durch die Stimulation mit den Überstandslösungen beeinflusst zu werden (Abb. 12). So zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen der MCP1-Spiegel der stimulierten DCs im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen (*mock*). Im Zeitverlauf konnte im Gegensatz zur I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression nur eine sehr geringe Steigerung der MCP1-Protein-Level insgesamt beobachtet werden.



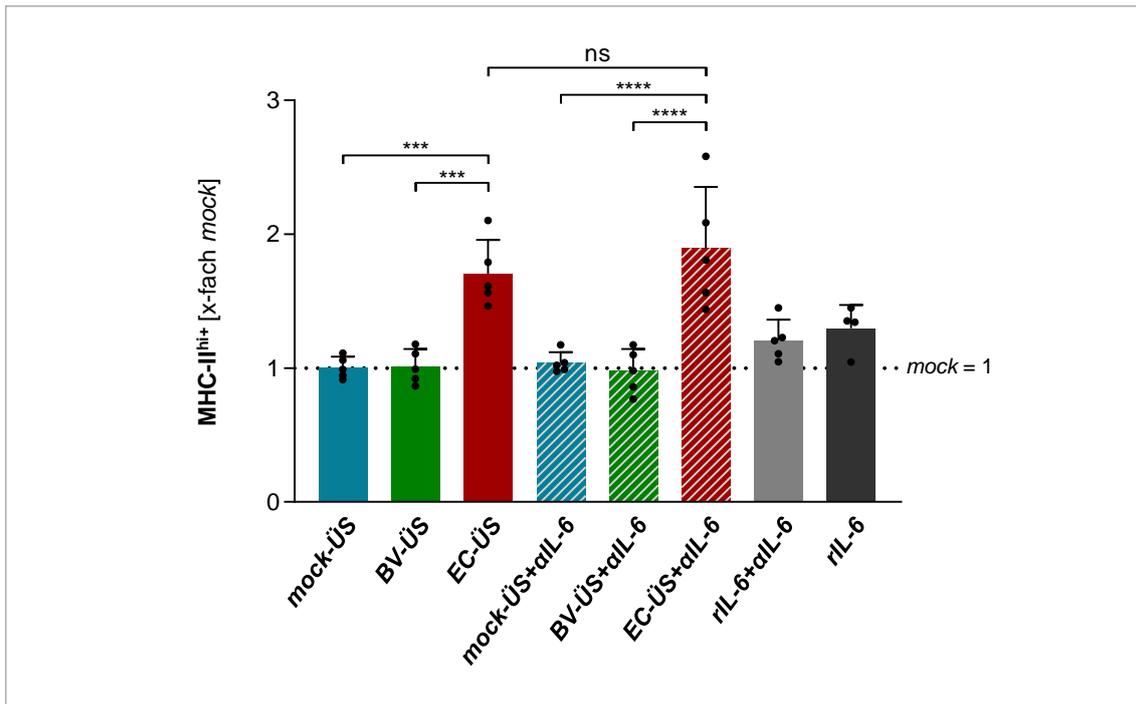
**Abb. 12: IκBζ- und MCP1P1-Expression in BMDCs nach Stimulation mit BMDC-Überständen.** *Tlr2*<sup>-/-</sup>*Tlr4*<sup>-/-</sup>-BMDCs wurden für 2 h, 4 h oder 16 h mit Überständen (30 % des finalen Volumens) von *B. vulgatus* mpk- (*BV-ÜS*), *E. coli* mpk- (*EC-ÜS*) (*MOI* = 1) oder nicht stimulierten BMDCs (*mock-ÜS*) stimuliert, Kontrollen wurden mit DC-Medium stimuliert (*mock*). Weitere Proben wurden mit den jeweiligen Überständen unter Zugabe von IL-6-neutralisierendem anti-IL-6-Antikörper ( $\alpha$ IL-6) stimuliert, wobei Kontrollen mit rekombinantem IL-6 (*rIL-6*) und *rIL-6* unter Zugabe von  $\alpha$ IL-6 stimuliert wurden. Die Expression von IκBζ- und MCP1P1-Protein wurde nach Ende der Stimulationszeit mithilfe von FACS quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. *n* = 4-5. ns: nicht signifikant.

Im Hinblick auf die Rolle von IL-6 in der Zytokin-vermittelten IκBζ- und MCP1P1-Expression in DCs ließen sich keine Unterschiede zwischen BMDCs, die mit den Überständen *mock-ÜS*, *BV-ÜS* oder *EC-ÜS* stimuliert worden waren und BMDCs, die mit den Überständen unter Zusatz von IL-6-antagonisierendem  $\alpha$ IL-6 stimuliert worden waren, feststellen. Auch die Stimulation mit *rIL-6* allein führte

unabhängig von der Stimulationsdauer zu keiner relevant veränderten Expression von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  und MCP1P1 auf Proteinebene im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Zur Beurteilung, ob sich das von bakteriell stimulierten DCs sezernierte Zytokin-Profil auf die Maturation von immaturren dendritischen Zellen auswirkte, wurde abschließend durch FACS-Analyse der Anteil an MHC-II<sup>hi+</sup>-BMDCs nach 16 h-Stimulation bestimmt.

Sowohl bei den *mock-ÜS*- als auch bei den *BV-ÜS*-stimulierten BMDCs war der Anteil an MHC-II<sup>hi+</sup>-Zellen nach 16 h Stimulation nicht erhöht, sondern auf dem Level der *mock*-Kontrolle (Abb. 13). Auch die Zugabe von  $\alpha\text{IL-6}$  zu den Überständen veränderte die MHC-II-Expression nicht. Bei Stimulation mit *EC-ÜS* zeigte sich hingegen ein Anstieg des Anteils an MHC-II<sup>hi+</sup>-DCs ( $1,7 \pm 0,3$ -fach), der damit signifikant höher ausfiel als in *mock-ÜS*- ( $1 \pm 0,1$ -fach) und *BV-ÜS*-stimulierten Proben ( $1 \pm 0,1$ -fach). Die Neutralisierung der Wirkung von IL-6 durch  $\alpha\text{IL-6}$  wirkte sich auch hier nicht auf die DC-Maturation aus, sodass der Anteil MHC-II<sup>hi+</sup>-DCs auch in der *EC-ÜS*+ $\alpha\text{IL-6}$ -Gruppe ( $1,9 \pm 0,5$ ; *ns vs. EC-ÜS*) signifikant gegenüber den anderen mit  $\alpha\text{IL-6}$  behandelten Überstand-stimulierten Gruppen *BV-ÜS*+ $\alpha\text{IL-6}$  ( $1 \pm 0,2$ -fach) und *mock-ÜS*+ $\alpha\text{IL-6}$  ( $1 \pm 0,1$ -fach) erhöht war. Im Gegensatz dazu stieg der MHC-II<sup>hi+</sup>-Anteil in *rIL-6*-stimulierten ( $1,3 \pm 0,2$ -fach) und *rIL-6*+ $\alpha\text{IL-6}$ -stimulierten ( $1,2 \pm 0,2$ -fach) Zellen nur leicht im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle an. Ein relevanter Unterschied zwischen der rIL-6-Stimulation mit oder ohne Zugabe von  $\alpha\text{IL-6}$  konnte nicht beobachtet werden.



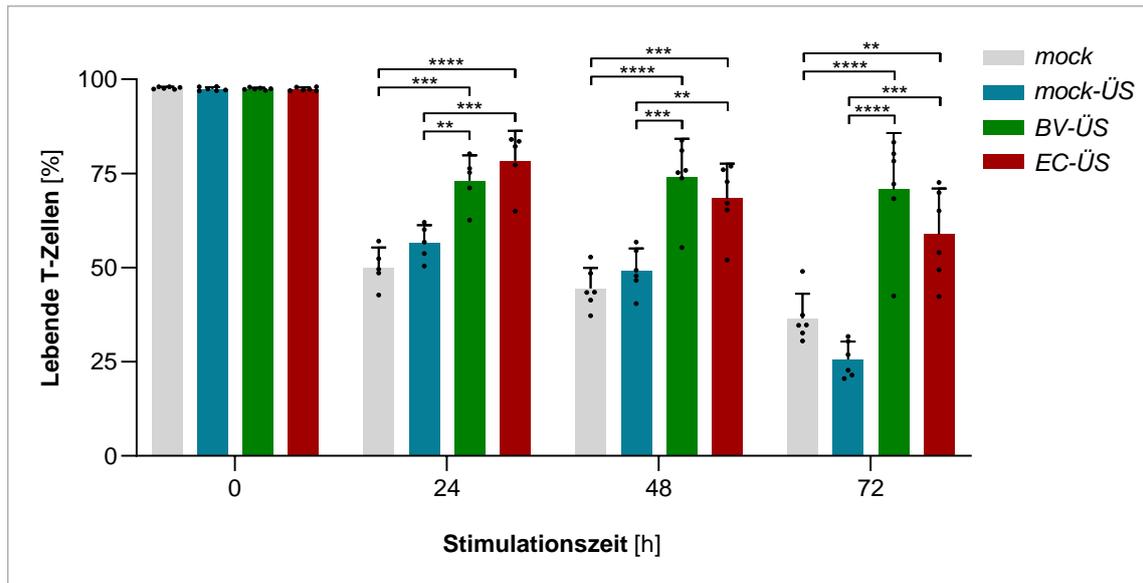
**Abb. 13: Maturation von BMDCs nach Stimulation mit BMDC-Überständen.** *Tlr2<sup>-/-</sup>xTlr4<sup>-/-</sup>*-BMDCs wurden mit Überständen (30 % des finalen Volumens) von *B. vulgatus* mpk- (*BV-ÜS*), *E. coli* mpk- (*EC-ÜS*) (*MOI* = 1) oder nicht stimulierten BMDCs (*mock-ÜS*) stimuliert, Kontrollen wurden mit DC-Medium stimuliert (*mock*). Weitere Proben wurden mit den jeweiligen Überständen unter Zugabe von IL-6-neutralisierendem anti-IL-6-Antikörper ( $\alpha$ IL-6) stimuliert, wobei Kontrollen mit rekombinatem IL-6 (rIL-6) und rIL-6 unter Zugabe von  $\alpha$ IL-6 stimuliert wurden. Nach 16 h Stimulationsdauer wurde der Anteil MHC-II<sup>hi+</sup>-BMDCs als Übersichtsmarker für die DC-Maturation in den einzelnen Stimulationsgruppen über Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte der auf die unstimulierten Kontrolle normierten MHC-II<sup>hi+</sup>-Anteile mit Standardabweichung.  $n = 4-5$ . ns: nicht signifikant. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Zusammenfassend konnte somit kein Effekt der von bakteriell stimulierten DCs sezernierten Zytokine auf die  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und MCP1-Expression immaturer DCs festgestellt werden, was autokrine Feedback-Loops bzw. parakrine Interaktion zwischen DCs im Rahmen der Regulation dieser Proteine unwahrscheinlich macht. Lediglich die DC-Maturation wurde durch Zytokine beeinflusst.

### 3.2 Einfluss von DC-Zytokinen auf Überleben und Differenzierung naiver T-Zellen

Nach Analyse des Effekts der in den DC-Überständen *mock-ÜS*, *BV-ÜS* und *EC-ÜS* enthaltenen Zytokine auf dendritische Zellen, sollte nachfolgend der Einfluss der unterschiedlichen Zytokin-Profile auf die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen charakterisiert werden. Hierfür wurden im Rahmen eines T-Zell-Polarisations-Assays naive murine *WT*-T-Zellen mithilfe von anti-CD3 $\epsilon$ - und anti-CD28-Antikörpern aktiviert und mit den Überständen in einer Konzentration von 50 % des finalen Volumens polarisiert, die Stimulation mit DC-Medium fungierte als Kontrolle (*mock*). Nach Ende der 0 h, 24 h, 48 h oder 72 h andauernden Polarisation wurden die T<sub>H</sub>-Zell-Untergruppen mithilfe der Durchflusszytometrie charakterisiert.

Bereits nach 24 h Polarisationszeit kam es zu einem deutlichen Abfall des Anteils lebender T-Zellen im Vergleich zur Ausgangssituation (Abb. 14). Dieser war jedoch in *BV-ÜS*- ( $73,1 \pm 6,7$  %) und *EC-ÜS*-stimulierten Proben ( $78,4 \pm 7,9$  %) signifikant geringer ausgeprägt. Dieser Trend setzte sich auch bei längeren Polarisationszeiten fort, sodass nach 72 h in der *mock*- ( $36,5 \pm 6,5$  %) und *mock-ÜS*-stimulierten Gruppe ( $25,6 \pm 4,8$  %) der Anteil lebender T-Zellen wesentlich geringer war als in den mit *BV-ÜS* und *EC-ÜS* stimulierten Proben. Zwar war der Prozentsatz vitaler Zellen nach 72 h in der *BV-ÜS*-Gruppe tendenziell am höchsten ( $70,8 \pm 14,9$  %), eine statistisch signifikante Erhöhung im Vergleich zur *EC-ÜS*-Gruppe ( $58,9 \pm 12,1$  %) ließ sich jedoch nicht nachweisen.



**Abb. 14: Überleben von T-Zellen nach Stimulation mit BMDC-Überständen.** Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit anti-CD3 $\epsilon$ - und anti-CD28-Antikörpern aktiviert und anschließend für 0 h, 24 h, 48 h oder 72 h mit Überständen (50 % des finalen Volumens) von *B. vulgatus* mpk- (*BV-ÜS*), *E. coli* mpk- (*EC-ÜS*) (*MOI* = 1) oder nicht stimulierten BMDCs (*mock-ÜS*) polarisiert, DC-Medium wurde als Kontroll-Stimulus (*mock*) verwendet. Nach Tot/Lebend-Färbung wurde in der FACS-Analyse der Anteil lebender T-Zellen nach den verschiedenen Polarisationszeiten bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung.  $n = 5-6$ . \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Aufgrund der beobachteten hohen Sterberate wurde bei der Untersuchung der T<sub>H</sub>-Subgruppen auf einen Ausschluss toter Zellen verzichtet (s. Abb. 3 & 4). Dieses Vorgehen ermöglichte die Analyse größerer absoluter Zellzahlen, wodurch eine bessere Aussagekraft über die T<sub>H</sub>-Zell-Subgruppen erreicht werden sollte.

In der Subgruppe der regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>), charakterisiert durch den Transkriptionsfaktor FoxP3 (Fontenot et al., 2003), konnten zunächst keine relevanten Unterschiede zwischen einzelnen Stimuli festgestellt werden (Abb. 15 A). Nach 48 h Polarisation konnten in *BV-ÜS*-stimulierten Proben signifikant mehr FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen (MFI 215,8  $\pm$  32,6) nachgewiesen werden als in der *EC-ÜS*- (MFI 156,5  $\pm$  16,2) und *mock-ÜS*-Gruppe (MFI 159,7  $\pm$  13,2). Relativ zu unstimulierten T-Zellen (*mock*) zeigte sich hingegen keine signifikante Veränderung (MFI 189,0  $\pm$  22,7). Auch verschwanden die beobachteten Unterschiede bei längerer Stimulationszeit (72 h) wieder. Die höchsten T<sub>reg</sub>-Zahlen ließen sich hier in der unstimulierten Gruppe vermuten

(MFI  $260,2 \pm 22,7$ ;  $p^{**}$  vs. *mock-ÜS*;  $p^{***}$  vs. *EC-ÜS*). Eine  $T_{reg}$ -induzierende Wirkung ließ sich damit am ehesten für *BV-ÜS* bei 48 h andauernder Polarisation feststellen.

Auch in der Gruppe der  $IL-10^+IL-17^+$  protektiven  $T_H17$ -Zellen (Esplugues et al., 2011) konnten zunächst keine signifikanten Stimulus-spezifischen Unterschiede beobachtet werden (Abb. 15 B). Erst nach 48 h Polarisationsdauer zeigten sich in der *BV-ÜS*- (MFI  $2188 \pm 268,5$ ) und *EC-ÜS*-Gruppe (MFI  $2059 \pm 204,8$ ; *ns* vs. *BV-ÜS*) erhöhte Zahlen protektiver  $T_H17$ -Zellen im Vergleich zur *mock-ÜS*-Gruppe (MFI  $1597 \pm 296,2$ ;  $p^{**}$  vs. *BV-ÜS*;  $p^*$  vs. *EC-ÜS*) und der unstimulierten Kontrolle (MFI  $1624 \pm 175,8$ ;  $p^{**}$  vs. *BV-ÜS*;  $p^*$  vs. *EC-ÜS*). Dies war nach 72 h noch ausgeprägter nachweisbar. Die Stimulation mit Überständen bakteriell stimulierter DCs schien somit die Polarisation naiver T-Zellen in protektive  $T_H17$ -Zellen zu begünstigen, wobei die Art des bakteriellen Stimulus keine Relevanz hatte.

In der Analyse der  $T_H1$ -Subgruppe mit dem Zytokin  $IFN-\gamma$  als FACS-Marker (Zhu, 2018) ließ sich nur bei einer Polarisationszeit von 48 h ein signifikant erhöhtes Level an  $T_H1$ -Zellen in der *EC-ÜS*-Gruppe (MFI  $1345 \pm 303,4$ ) im Vergleich zur *BV-ÜS*-polarisierten Gruppe (MFI  $829,8 \pm 114,7$ ) beobachten (Abb. 15 C). Diese Konstellation war nach 72 h wieder aufgehoben, sodass ein  $T_H1$ -induzierender Effekt von *EC-ÜS* am ehesten für eine Polarisationszeit von 48 h vermutet werden konnte.

Die Untersuchung der  $T_H2$ -Zellen mithilfe ihres charakteristischen Zytokins IL-4 als FACS-Marker (Zhu, 2018) zeigte ein ähnliches zeitabhängiges Polarisationsverhalten wie die anderen T-Zell-Subgruppen (Abb. 15 D). So zeigten sich auch hier erst nach 48 h Unterschiede zwischen den verschiedenen Polarisationsgruppen im Sinne einer signifikant gesteigerten  $T_H2$ -Differenzierung in *BV-ÜS*-stimulierten T-Zellen (MFI  $342,5 \pm 29,8$ ) im Vergleich zu *EC-ÜS*- (MFI  $286,0 \pm 19,2$ ), *mock-ÜS*- (MFI  $275,3 \pm 24,8$ ) und unstimulierten Zellen (MFI  $291,0 \pm 30,1$ ). Während auch noch nach 72 h in der *BV-ÜS*-Gruppe eine signifikant höhere  $T_H2$ -Zahl (MFI  $441,7 \pm 37,3$ ) als in den beiden anderen Überstand-stimulierten Gruppen nachweisbar war, stieg die nur mit DC-Medium

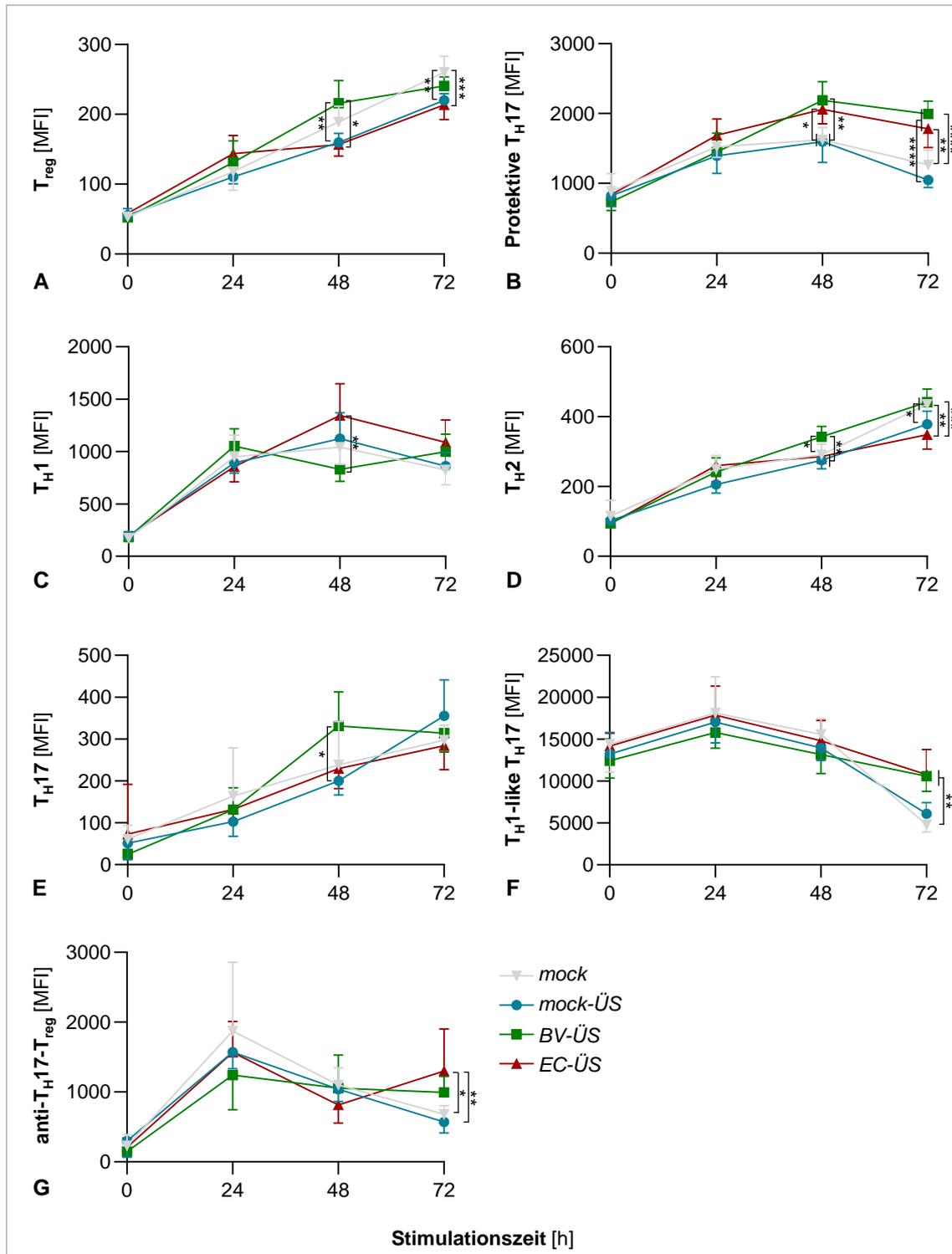
stimulierte *mock*-Kontrolle (MFI  $435,8 \pm 11,4$ ;  $p^{**}$  vs. *EC-ÜS*;  $p^*$  vs. *mock-ÜS*) auf das Level der *BV-ÜS*-polarisierten Zellen an.

Innerhalb der  $T_H17$ -Zellen (Abb. 15 E), charakterisiert mithilfe des FACS-Markers ROR $\gamma$ t (McGeachy et al., 2019), zeigte sich nur nach 48 h Polarisationsdauer in der *BV-ÜS*-stimulierten Gruppe eine statistisch signifikante Erhöhung der  $T_H17$ -Fluoreszenz (MFI  $331,3 \pm 81,0$ ) im Vergleich zur *mock-ÜS*-polarisierten Gruppe (MFI  $200,2 \pm 34,0$ ), nicht jedoch in Relation zu *EC-ÜS*- (MFI  $229,2 \pm 47,8$ ) oder unstimulierten T-Zellen (MFI  $238,5 \pm 103,4$ ). Nach 72 h Polarisierung konnten keine Stimulus-abhängigen Unterschiede in der  $T_H17$ -Differenzierung festgestellt werden.

Die Anzahl der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>  $T_H1$ -like- $T_H17$ -Zellen (Bending et al., 2009) veränderte sich über den Großteil des beobachteten Polarisationszeitraumes nicht wesentlich Stimulus-abhängig (Abb. 15 F). Erst nach 72 h zeigte sich, vermittelt durch eine geringer ausgeprägte Abnahme des anti- $T_H17$ - $T_{reg}$ -Levels in der *BV-ÜS*- (MFI  $10572 \pm 1799$ ) und *EC-ÜS*-stimulierten Gruppe (MFI  $10775 \pm 2968$ ), ein statistisch signifikanter Unterschied zur anti- $T_H17$ - $T_{reg}$ -Zahl in *mock*- (MFI  $4795 \pm 872,9$ ) und *mock-ÜS*-polarisierten Zellen (MFI  $6085 \pm 1336$ ).

Auch in der Analyse der FoxP3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> anti- $T_H17$ - $T_{reg}$ -Zellen (Ueno et al., 2013) konnten erst nach 72 h Polarisationszeit relevante stimuluspezifische Unterschiede beobachtet werden (Abb. 15 G). So waren die anti- $T_H17$ - $T_{reg}$ -Zellen in *EC-ÜS*-stimulierten Zellen (MFI  $1298 \pm 604,7$ ) relativ zur *mock*- (MFI  $682,5 \pm 121,7$ ) und *mock-ÜS*-Gruppe (MFI  $572,2 \pm 157$ ) statistisch signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu zeigte sich keine signifikante Veränderung im Vergleich zur *BV-ÜS*-Gruppe (MFI  $993 \pm 230,7$ ).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die Stimulation naiver, aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Überständen bakteriell stimulierter BMDCs protektiv auf das Zell-Überleben auswirkte. Bezüglich der T-Zell-Differenzierung konnte für das Zytokin-Profil *B. vulgatus* mpk-stimulierter DCs ein tendenziell fördernder Effekt auf die Differenzierung protektiver  $T_H$ -Subgruppen beobachtet werden.



**Abb. 15: Polarisation naiver T-Zellen mit BMDC-Überständen.** Naive  $CD4^+$  T-Zellen wurden mit anti- $CD3\epsilon$ - und anti- $CD28$ -Antikörpern aktiviert und anschließend für 0 h, 24 h, 48 h oder 72 h mit Überständen (50 % des finalen Volumens) von *B. vulgatus* mpk- (*BV-ÜS*), *E. coli* mpk- (*EC-ÜS*) ( $MOI=1$ ) oder nicht stimulierten BMDCs (*mock-ÜS*) polarisiert, DC-Medium wurde als Kontroll-Stimulus (*mock*) verwendet. Anschließend wurden die angegebenen T-Zell-Subgruppen innerhalb der einzelnen Polarisationskonditionen via FACS-Analyse quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung.  $n=5-6$ . \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 3.3 Expression von I $\kappa$ B $\zeta$ und MCP1P1 in intestinalen Epithelzellen

Da die Bakterien-Stämme *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk als Teil der intestinalen Mikrobiota *in vivo* nicht nur zu dendritischen Zellen, sondern in erster Linie auch zu den intestinalen Epithelzellen in räumlicher Nähe stehen, sollte schließlich untersucht werden, ob sich die Interaktion mit den bakteriellen Stämmen auch auf eine mögliche I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCP1P1-Expression in intestinalen Epithelzellen auswirkt. Dazu wurden murine intestinale Epithelzellen der Zelllinie mIC<sub>cl2</sub> kultiviert und für Stimulationszeiten von 0 h, 1 h, 2 h, 4 h oder 16 h mit *B. vulgatus* mpk oder *E. coli* mpk bei einer *MOI* = 10 stimuliert, Kontroll-Proben blieben unstimuliert (*mock*). Die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  und MCP1P1 wurde schließlich auf RNA- und Protein-Ebene durch qPCR- und FACS-Analyse der stimulierten Zellen evaluiert.

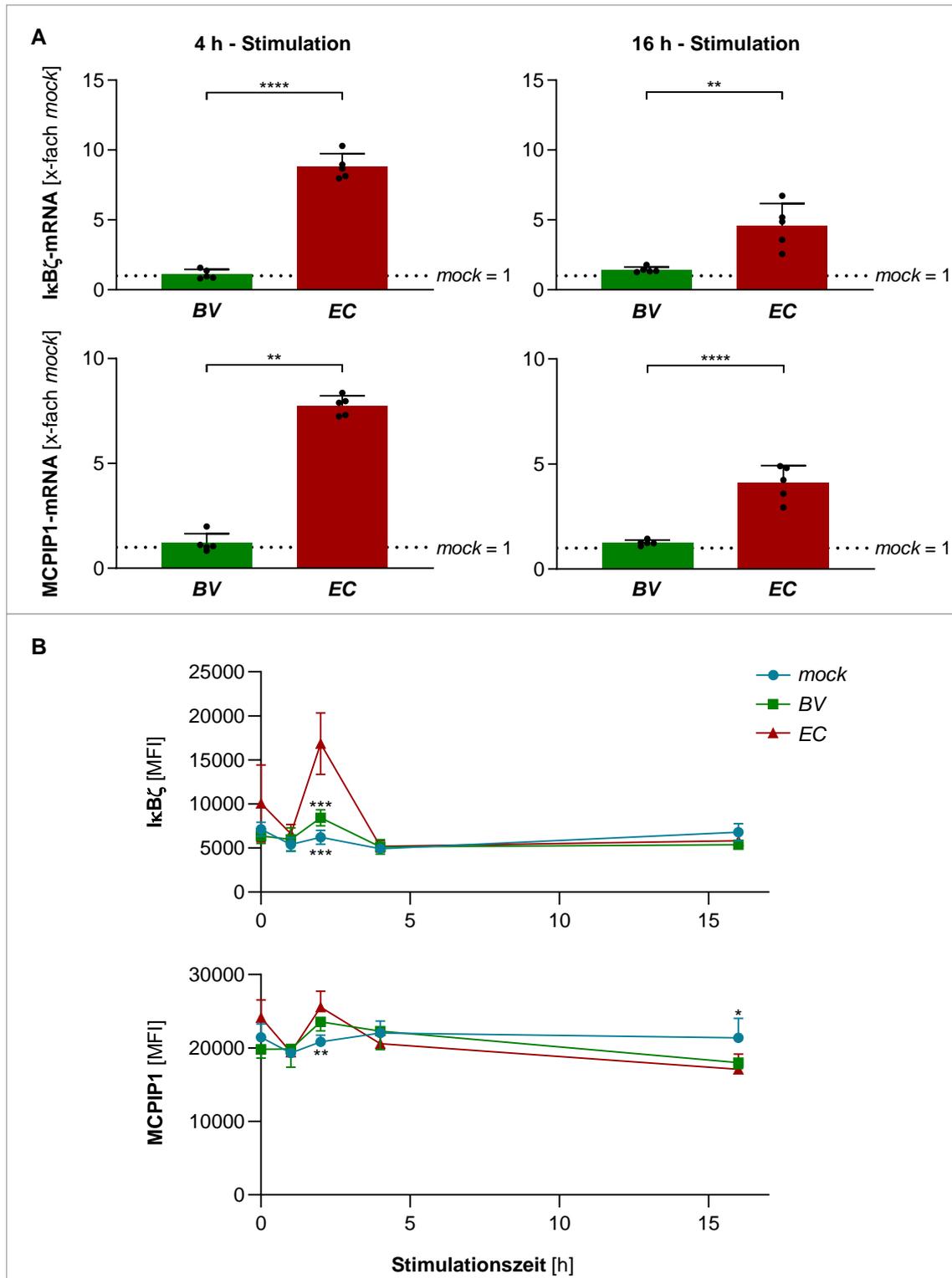
Die Stimulation von mIC<sub>cl2</sub>-Zellen mit *E. coli* mpk für 4 h hatte einen deutlichen Anstieg des intrazellulären I $\kappa$ B $\zeta$ -mRNA-Levels ( $8,8 \pm 0,9$ -fach) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zur Folge (Abb. 16 A). Nach 16 h Stimulation sank dieser auf ca. 50 % des 4 h-Wertes ab ( $4,6 \pm 1,6$ -fach). Im Gegensatz dazu führte die Stimulation mit *B. vulgatus* mpk sowohl für 4 h ( $1,1 \pm 0,3$ -fach) als auch für 16 h ( $1,4 \pm 0,2$ -fach) zu keinem deutlichen Anstieg der I $\kappa$ B $\zeta$ -mRNA verglichen mit *mock* und war damit signifikant niedriger ausgeprägt als in der jeweiligen *E. coli* mpk-stimulierten Gruppe. Im Zeitverlauf zeigte sich keine relevante Veränderung der I $\kappa$ B $\zeta$ -mRNA-Expression in *B. vulgatus* mpk-stimulierten Zellen für die untersuchten Stimulationszeiten.

Auch für die MCP1P1-mRNA-Expression konnten vergleichbare Ergebnisse beobachtet werden (Abb. 16 A). So führte die Stimulation mit *E. coli* mpk auch hier zu einer deutlichen Induktion der MCP1P1-mRNA nach 4 h ( $7,8 \pm 0,5$ -fach). Vergleichbar zum Verhalten von I $\kappa$ B $\zeta$  fiel auch die MCP1P1-mRNA nach 16 h Stimulation auf ca. die Hälfte ab ( $4,1 \pm 0,8$ -fach). Mit *B. vulgatus* mpk stimulierte mIC<sub>cl2</sub>-Epithelzellen wiesen hingegen nach 4 h Stimulationszeit keine relevante Erhöhung der MCP1P1-mRNA im Vergleich zu *mock*-stimulierten Zellen

auf ( $1,2 \pm 0,5$ -fach;  $p^{**}$  vs. EC). Auch nach 16 h Stimulation blieb die MCP1P1-mRNA hier ungefähr auf dem Level der unstimulierten Kontrolle ( $1,3 \pm 0,1$ -fach;  $p^{****}$  vs. EC).

Auf Ebene der Protein-Expression (Abb. 16 B) hatte die Stimulation mit *E. coli* mpk erst nach 2 h Stimulationsdauer einen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle signifikanten Anstieg der  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -Spiegel (MFI  $16842 \pm 3473$ ) zur Folge, *B. vulgatus* mpk-stimulierte Epithelzellen (MFI  $8431 \pm 912,8$ ) zeigten hingegen auch nach 2 h nur eine leicht gegenüber der *mock*-Gruppe (MFI  $6208 \pm 805$ ) erhöhte und damit im Vergleich zu *E. coli* mpk-stimulierten  $\text{mIC}_{\text{cl2}}$ -Zellen signifikant geringere  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -Protein-Expression (Michaelis et al., 2021). Bei längeren Stimulationszeiten sank  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  in beiden bakteriell stimulierten Gruppen wieder auf das ursprüngliche Level der unstimulierten Kontrolle ab.

In der FACS-Analyse der MCP1P1-Protein-Expression (Abb. 16 B) konnte in der Ausgangskonstellation nach 0 h Stimulation ein zwar statistisch signifikanter, jedoch geringer Unterschied zwischen *E. coli* mpk- (MFI  $24120 \pm 2414$ ) und *B. vulgatus* mpk-stimulierter Gruppe (MFI  $19800 \pm 1185$ ) festgestellt werden. Dieser war nach 1 h Stimulation nicht mehr zu beobachten, die MCP1P1-Spiegel befanden sich unabhängig von bakterieller Stimulation auf Höhe der nicht stimulierten Kontrolle. Auch in der MCP1P1-Protein-Expression konnte nach 2 h Stimulation eine signifikante Erhöhung der MCP1P1-Level in *E. coli* mpk-stimulierten Epithelzellen (MFI  $25557 \pm 2178$ ) im Vergleich zu *mock* (MFI  $20812 \pm 941$ ) festgestellt werden, welche im Zeitverlauf nach 4 h wieder auf *mock*-Level zurückging (MFI  $20583 \pm 1195$ ). Nach 16 h Stimulation mit *E. coli* mpk fiel der MCP1P1-Protein-Spiegel schließlich sogar signifikant geringer aus (MFI  $17086 \pm 2090$ ) als in nicht stimulierten  $\text{mIC}_{\text{cl2}}$ -Zellen (MFI  $21392 \pm 2621$ ). In *B. vulgatus* mpk-stimulierten Epithelzellen konnten hingegen abgesehen von einer tendenziellen Erhöhung des MCP1P1-Proteins (MFI  $23571 \pm 1250$ ; *ns* vs. *mock*) gegenüber der *mock*-Kontrolle (MFI  $20812 \pm 941$ ) nach 2 h Stimulation keine relevanten Änderungen der MCP1P1-Protein-Expression festgestellt werden.



**Abb. 16:  $I\kappa B\zeta$ - und MCP1-Expression in  $mIC_{d2}$ -Zellen nach Stimulation mit kommensalen Bakterienstämmen.**  $mIC_{d2}$ -Zellen wurden für 0 h, 1 h, 2 h, 4 h oder 16 h mit *B. vulgatus* mpk (BV) oder *E. coli* mpk (EC) (MOI = 10) stimuliert, Kontrollen blieben unstimuliert (mock). Die Expression von  $I\kappa B\zeta$  und MCP1 wurde anschließend auf RNA-Ebene mithilfe von qPCR (A), auf Protein-Ebene via FACS (B) analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung.  $n = 4-5$ . \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. EC. (A:  $I\kappa B\zeta$  (4 h) & B:  $I\kappa B\zeta$  modifiziert nach Michaelis et al., 2021)

In Zusammenschau der Ergebnisse konnte somit auch in intestinalen Epithelzellen die Expression von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  und MCP1P1 vor allem durch Stimulation mit *E. coli* mpk induziert werden. Diesbezüglich scheinen die untersuchten Modell-Kommensalen auf intestinale Epithelzellen einen ähnlichen Effekt auszuüben wie auf dendritische Zellen (Michaelis et al., 2021).

## 4 Diskussion

Wie einleitend angesprochen, kann die intestinale Mikrobiota die Funktion des Immunsystems entscheidend beeinflussen (El Aidy et al., 2012). Dies zeigt sich auch dadurch, dass ungünstige Veränderungen der Mikrobiota, im Sinne einer intestinalen Dysbiose, mit Erkrankungen wie CED assoziiert sein können (Ni et al., 2017). Da auch Veränderungen der in Immunsignalwegen beteiligten Proteine  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  und MCPIP1 in CED-Patienten beobachtet werden konnten (Kakiuchi et al., 2020; Nanki et al., 2020), lag der Fokus dieser Arbeit darauf, die Beeinflussung dieser Proteine durch patho- und symbiontische Modell-Kommensalen und die daraus resultierenden Veränderungen der Funktion von im Rahmen der CED-Pathogenese relevanten Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, insbesondere DCs und  $\text{T}_{\text{H}17}$ -Zellen, zu charakterisieren. Die bereits berichteten Ergebnisse sollen nun diskutiert und hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz eingeordnet werden.

### 4.1 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ und MCPIP1 in dendritischen Zellen

Im Rahmen von zurückliegenden Untersuchungen konnte bereits die Stimulus-abhängige Expression von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  in verschiedenen Zelltypen wie Makrophagen (Yamazaki et al., 2001), Monozyten (Seshadri et al., 2009), T-Zellen (Okamoto et al., 2010) und humanen dendritischen Zellen (Cardone et al., 2014) nachgewiesen werden. Auch die Expression von MCPIP1 wurde bereits beispielsweise in Makrophagen (Liang et al., 2008; Matsushita et al., 2009), Fibroblasten (Iwasaki et al., 2011), T-Zellen (Uehata et al., 2013) und verschiedenen Epithelzell-Typen (Dobosz et al., 2016) beobachtet. In dieser Studie konnte nun sowohl die  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - als auch die MCPIP1-Expression in murinen BMDCs nach Stimulation mit den kommensalen Bakterien-Stämmen *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk *in vitro* nachgewiesen werden, wobei sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Stämmen zeigten. So führte die Stimulation von BMDCs mit *E. coli* mpk zu einer deutlich stärkeren Induktion der

I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene im Vergleich zur Stimulation mit *B. vulgatus* mpk (Michaelis et al., 2021). Diese stärker ausgeprägte Immunreaktion in DCs bei *E. coli* mpk-Kontakt konnte in früheren Studien als starke Aktivierung und Maturation von DCs durch *E. coli* mpk beobachtet werden, während die Stimulation von DCs mit *B. vulgatus* mpk lediglich zu einem semimaturen Phänotyp führte (Frick et al., 2006; Maerz et al., 2018). Auch *in vivo* konnte bei Kolonisation von IL-2-defizienten Mäusen mit *E. coli* mpk eine stärkere Aktivierung und Maturation von DCs der intestinalen Lamina propria beobachtet werden als bei Kolonisation mit *B. vulgatus* mpk (Müller et al., 2008). Ebenso wurde eine protektive Rolle von *B. vulgatus* mpk bezüglich der Colitis-Entstehung im Maus-Modell (Waidmann et al., 2003) und ein Remissions-fördernder Einfluss bei bestehender Colitis (Steimle et al., 2019) in der Vergangenheit beschrieben. Beim Vergleich der Studienlage mit der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen unterschiedlich starken Induktion von I $\kappa$ B $\zeta$  durch *E. coli* mpk und *B. vulgatus* mpk lässt sich eine wichtige Rolle dieses Proteins in den durch diese Bakterien-Stämme ausgelösten, DC-vermittelten Immunreaktion vermuten.

Auch die in dieser Studie beobachtete stärkere Induktion der MCP1P1-mRNA-Expression in Folge einer Stimulation mit *E. coli* mpk im Vergleich zur Stimulation der BMDCs mit *B. vulgatus* mpk scheint insofern plausibel zu sein, als dass in der Literatur eine Rolle von MCP1P1 als Feedback-Inhibitor sowohl der Makrophagen-Aktivierung (Liang et al., 2008) als auch des proinflammatorischen IL-17-Signalwegs (Garg et al., 2015; Monin et al., 2017) beschrieben ist. So kann die ausgeprägte Hochregulation von MCP1P1-mRNA nach Stimulation der BMDCs mit *E. coli* mpk als Gegenreaktion zur starken Aktivierung der DCs, die sich unter anderem in der erhöhten I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression ausdrückt, gedeutet werden. Da die Konfrontation von DCs mit *B. vulgatus* mpk gemessen an der beobachteten I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression nur eine geringe Reaktion nach sich zog, erscheint es plausibel, dass auch die Hochregulation von MCP1P1 als I $\kappa$ B $\zeta$ -Gegenspieler (Garg et al., 2015) in *B. vulgatus* mpk-stimulierten DCs geringer ausfiel.

Eine Induktion der MCPIP1-Expression nach proinflammatorischer Stimulation mit TLR-Agonisten wie LPS wurde auch in Makrophagen und Monozyten beschrieben. Tatsächlich kam es in diesen Untersuchungen jedoch nicht nur zu einem Anstieg der mRNA-Level von MCPIP1, sondern auch zu einer Induktion der MCPIP1-Protein-Expression. (Liang et al., 2008; Blazusiak et al., 2013) Warum im Gegensatz dazu in dieser Studie zwar ein *E. coli* mpk-induzierter Anstieg der MCPIP1-Expression auf mRNA-Level, nicht aber auf Protein-Ebene nachgewiesen werden konnte, könnten mehrere Erklärungsmöglichkeiten beantworten. Zum einen ist in der Literatur eine konstitutive Expression von MCPIP1 für diverse Zelltypen wie Fibroblasten und Makrophagen (Iwasaki et al., 2011), Keratinozyten (Muromoto et al., 2019) und T-Zellen (Uehata et al., 2013; Jeltsch et al., 2014) vorbeschrieben. In Einklang damit könnte der MCPIP1-Protein-Spiegel bereits in unstimulierten DCs so hoch sein, dass aus einer bakteriellen Stimulation keine deutlichen, sichtbaren Veränderungen resultieren. Jedoch könnten ebenso methodenabhängige Einflüsse dazu geführt haben, dass Stimulus-abhängige Unterschiede der MCPIP1-Protein-Level nicht detektierbar waren. Neben einer unspezifischen Bindung des anti-MCPIP1-FACS-Antikörpers kommen hier auch sonstige Umwelteinflüsse im Rahmen der Durchführung des Experimentes in Betracht. Letztere Möglichkeit wird dadurch unterstützt, dass sich in einem späteren Experiment nach 16 h Stimulation zumindest eine leichte Erhöhung des MCPIP1-Protein-Spiegels nach *E. coli* mpk-Stimulation im Vergleich zur *B. vulgatus* mpk- oder *mock*-stimulierten Gruppe in *WT*-DCs zeigte (s. Abb. 10 B).

Auch in der Analyse der von bakteriell stimulierten DCs sezernierten Zytokine bestätigte sich der beobachtete unterschiedliche Einfluss der Modell-Kommensalen auf die DC-vermittelte Immunantwort. So scheint *E. coli* mpk zu einer stärkeren Sekretion der  $T_H17$ -induzierenden (Bettelli et al., 2006; Acosta-Rodriguez et al., 2007; Mailer et al., 2015) Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$  und IL-23 zu führen als *B. vulgatus* mpk (Michaelis et al., 2021). Dies bestätigt vorausgegangene Arbeiten, in denen ebenfalls eine fördernde Rolle von *E. coli* mpk auf die Sekretion dieser proinflammatorischen Zytokine durch DCs festgestellt wurde (Frick et al., 2006; Maerz et al., 2018; Steimle et al., 2019).

Auch die erhöhte Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 durch DCs nach *E. coli* mpk-Kontakt ist bereits *in vitro* (Frick et al., 2006; Steimle et al., 2019) und *in vivo* (Waidmann et al., 2003) vorbeschrieben und kann als Gegenreaktion auf den starken Immunstimulus durch *E. coli* mpk gedeutet werden.

Im Rahmen der Stimulation von BMDCs mit unterschiedlich zusammengesetzten intestinalen Mikrobiota-Suspensionen bestätigten sich die vermuteten immunregulierenden Eigenschaften von *B. vulgatus* mpk. So hatte auch in diesem der *in vivo*-Situation näherkommenden Setting, in dem DCs nicht nur mit einzelnen Bakterien, sondern einer komplex zusammengesetzten Mikrobiota in Kontakt kamen, eine veränderte Mikrobiota-Komposition eine differentielle I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCP1-Aktivierung zur Folge. Ein erhöhter Anteil an *B. vulgatus* mpk innerhalb der Mikroflora scheint somit tendenziell zu geringerer Induktion von I $\kappa$ B $\zeta$  und MCP1 zu führen und auch die Analyse der von den DCs sezernierten Zytokine lässt einen tendenziell regulierenden Einfluss von *B. vulgatus* mpk auf die Sekretion der untersuchten Zytokine auch im Zusammenspiel mit anderen intestinalen Mikroorganismen vermuten (Michaelis et al., 2021).

Diesem regulierenden Einfluss von *B. vulgatus* mpk innerhalb der verwendeten intestinalen Mikrobiota könnten verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. So könnte die zusätzliche Applikation des schwach immunogenen *B. vulgatus* mpk (Maerz et al., 2019) über das Trinkwasser zu einer Verdrängung stärker immunogener Stämme im Darm der Mäuse geführt haben. *B. vulgatus* mpk könnte so durch Ausbildung einer Art Kolonisierungsresistenz zu verminderten Zahlen stark immunogener Bakterien in der *DYSBV+TC*-Mikrobiota geführt haben, was in einer verminderten Induktion von I $\kappa$ B $\zeta$ , MCP1 und Zytokinen resultierte. Jedoch könnte auch eine aktiv regulierende Wirkung von *B. vulgatus* mpk auf DCs, die immunogenen Effekten anderer Mikrobiota-Bestandteile entgegenwirkt, dazu beitragen. Passend hierzu erklärten Waidmann et al. in einer zurückliegenden Studie, in der sich die Co-Kolonisation von IL-2-KO-Mäusen mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk protektiv auf die Entstehung einer Colitis im Vergleich zur Mono-Kolonisation mit *E. coli* mpk auswirkte, den protektiven Effekt von *B. vulgatus* mpk mit einer direkten interbakteriellen

Interaktion zwischen den beiden Stämmen (Waidmann et al., 2003). Im hier verwendeten Versuchsdesign kann eine Interaktion zwischen den Mikrobiota-Stämmen während der Stimulation durch die vorausgehende Hitze-Inaktivierung der Mikrobiota-Suspensionen ausgeschlossen werden. Jedoch könnte es bereits zuvor zu Wechselwirkungen gekommen sein, sodass beispielsweise auch eine *B. vulgatus* mpk-bedingte Herabregulation der Expression immunogener Bestandteile in anderen Bakterien zur insgesamt verringerten Immunogenität der *DYSBV+TC*-Mikrobiota geführt haben könnte.

Interessanterweise fällt beim Vergleich der Daten aus der Einzelstimulation von DCs mit *E. coli* mpk (s. Abb. 6) mit den Ergebnissen der Mikrobiota-Stimulation (s. Abb. 8) auf, dass die Stimulation von DCs mit Mikrobiota-Suspensionen generell zu einer schwächeren  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -Induktion führte. Dies spricht dafür, dass in den verwendeten Mikrobiota-Suspensionen auch ohne Anreicherung mit *B. vulgatus* mpk bereits weniger immunogene oder mehr immunregulierende Stämme enthalten waren. Abschließend klären lassen sich Vermutungen über die Mikrobiota-Zusammensetzung jedoch nur beispielsweise via 16S-rDNA-Sequenzierung.

Als Zwischenfazit lässt sich somit festhalten, dass sich die unterschiedliche Immunogenität kommensaler Mikroorganismen (Maerz et al., 2019) auch in einer differentiellen Induktion von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  und MCPIP1 widerspiegelt. Schwach immunogene (Maerz et al., 2019), symbiontische Kommensale wie *B. vulgatus* mpk scheinen hier einen regulierenden Effekt auszuüben (Michaelis et al., 2021). Dass sich dies auf nachgeschaltete DC-abhängige Immunreaktionen auswirken kann, zeigte sich auch im Rahmen der T-Zell-Polarisation. Auch hier schien *B. vulgatus* mpk tendenziell eher protektive  $\text{T}_\text{H}$ -Subgruppen zu induzieren, was später noch genauer diskutiert werden soll. Ein Zusammenhang zwischen den Unterschieden in den von *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk ausgelösten Immunreaktionen und der  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und MCPIP1-Expression in DCs liegt nahe, muss jedoch in weiterführenden Studien, beispielsweise mithilfe von Knockout-Modellen der Proteine, bewiesen werden.

Auf der Suche nach den Signalwegen, über die die Modell-Kommensale ihre unterschiedliche Immunogenität auf DCs vermitteln, konnte mithilfe von TLR-Knockout-Modellen gezeigt werden, dass vor allem TLR4 und teilweise auch TLR2 für die *E. coli* mpk-induzierte Expression von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  (Michaelis et al., 2021) und MCPIP1 in DCs verantwortlich ist. Für *B. vulgatus* mpk war dies zunächst zwar tendenziell, jedoch nicht mit statistischer Signifikanz nachweisbar, sodass sich die Frage stellte, ob *B. vulgatus* mpk eventuell über andere Mechanismen als TLR4/TLR2 von DCs erkannt wird oder die geringe Immunität dieses Stammes (Maerz et al., 2019) nur zu einer so gering ausgeprägten  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und MCPIP1-Reaktion führte, dass TLR-Status-abhängige Unterschiede schlicht nicht sichtbar waren. Hier konnte die Analyse der DC-Maturation die letztere Hypothese bekräftigen. Gleichsinnig zu den *E. coli* mpk-stimulierten Gruppen zeigte sich auch bei Stimulation mit *B. vulgatus* mpk eine statistisch signifikante Reduktion des Anteils MHC-II<sup>hi</sup>-DCs in den Genotypen *Tlr4*<sup>-/-</sup> und *Tlr2*<sup>-/-</sup>*xTlr4*<sup>-/-</sup> im Vergleich zum Wildtyp (s. Abb. 11). Zwar bietet die Analyse des Anteils MHC-II<sup>hi</sup>-DCs an der gesamten DC-Population nur einen Überblick über die Maturation, die Ergebnisse zurückliegender Versuche, in denen die Aktivierung und Maturation von DCs genauer über FACS-Analyse von Oberflächenmarkern und Bestimmung der Zytokin-Sekretion untersucht wurde, bestätigen die hier beobachteten Zusammenhänge jedoch (Maerz et al., 2018). So kann abschließend festgestellt werden, dass TLR4 und partiell auch TLR2 eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der Induktion der  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und MCPIP1-Expression auf die Stimulation von DCs mit sowohl *E. coli* mpk als auch *B. vulgatus* mpk hin zu haben scheinen.

Die starke Abhängigkeit der  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und MCPIP1-Induktion nach bakterieller Stimulation von TLR4, dessen Ligand bakterielles LPS ist (Chow et al., 1999), weist auf eine entscheidende Rolle des LPS der Gram-negativen Bakterien *E. coli* mpk und *B. vulgatus* mpk bezüglich ihrer immunologischen Eigenschaften hin (Michaelis et al., 2021). Tatsächlich konnten Steimle et al. bereits zeigen, dass isoliertes LPS der Stämme zu ähnlichen immunologischen Reaktionen *in vitro* und *in vivo* führte wie die jeweiligen Bakterien (Steimle et al., 2019). Angesichts dieser Erkenntnisse und der Tatsache, dass TLR2 vor allem als

Rezeptor für Liganden aus Gram-positiven Bakterien wie Peptidoglykan oder Lipoteichonsäure (Schwandner et al., 1999; Michelsen et al., 2001) bekannt ist, erscheint eine partielle Abhängigkeit des *E. coli* mpk- und *B. vulgatus* mpk-Signalwegs in DCs von TLR2 zunächst kontraintuitiv. Da TLR2 jedoch ebenfalls durch bakterielle Lipoproteine aus Gram-negativen Bakterien aktiviert werden kann (Aliprantis et al., 1999; Shin et al., 2011), kann eine gewisse Rolle von TLR2 bei der Induktion der  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und MCPIP1-Expression durch *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk durchaus realistisch sein. Die Ergebnisse der TLR-Knockout-Versuche sprechen insofern deutlich dafür, dass TLR2 gemeinsam mit TLR4 zur kommensal vermittelten  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und MCPIP1-Induktion beiträgt, als dass RNA- und Proteinlevel bei zusätzlichem Verlust von TLR2 in *Tlr2*<sup>-/-</sup>*xTlr4*<sup>-/-</sup>-DCs noch etwas niedriger liegen als bei alleinigem Fehlen von TLR4 in *Tlr4*<sup>-/-</sup>-Zellen (Michaelis et al., 2021).

Dass beide TLRs auch im humanen Darm eine entscheidende Funktion bei der Interaktion des Immunsystems mit der intestinalen Mikrobiota und in Bezug auf die intestinale Homöostase haben können, zeigt die Entdeckung, dass TLR2 und TLR4 in Colon-DCs von CED-Patienten erhöht sind im Vergleich zur Situation in gesunden Probanden (Hart et al., 2005). Nachdem im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und MCPIP1-Induktion durch bakterielle Stimuli TLR2- und TLR4-abhängig sein kann, ergibt sich somit ein weiterer Hinweis auf eine Verbindung zwischen der Expression dieser Proteine in DCs und der Entstehung von CED. Die von Hart et al. festgestellte Erhöhung der Expression von TLR2 und TLR4 in DCs von CED-Patienten (Hart et al., 2005) verdeutlicht in Zusammenschau mit den im Rahmen der TLR-Knockout-Versuche dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse auch die Rolle von *B. vulgatus* mpk als Beispiel für einen Symbionten bzw. von *E. coli* mpk als Beispiel für einen Pathobionten, deren jeweilige immunologischen Eigenschaften nur bei genetischer Suszeptibilität Auswirkungen auf das Immunsystem des Wirtes haben. So wäre bei erhöhter Expression von TLR2 und TLR4 in intestinalen DCs (im Sinne einer gegebenen Suszeptibilität des Wirtes) eine vermehrte Interaktion mit *B. vulgatus* mpk mit einer vermutlich deutlich geringeren TLR-Aktivierung verbunden als die überwiegende Interaktion mit

*E. coli* mpk. Auch die entsprechende Immunantwort, unter anderem im Sinne einer Induktion von I $\kappa$ B $\zeta$  und MCPIP1, wäre bei vermehrter Interaktion mit *B. vulgatus* mpk vermutlich geringer ausgeprägt. Da beide Stämme ursprünglich aus Mäusen isoliert wurden (Waidmann et al., 2003), ist eine tatsächliche Rolle dieser Bakterien in humaner CED unwahrscheinlich. Eine erhöhte TLR-Expression in Maus-Colitis-Modellen oder eine vermehrte Interaktion mit humanen Pathobionten durch die beschriebene erhöhte TLR2/TLR4-Expression in CED-Patienten (Hart et al., 2005) könnten jedoch Elemente in der Pathogenese der Erkrankung in der jeweiligen Spezies sein.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die für I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCPIP1-Induktion relevante Kommunikation zwischen Kommensalen und dendritischen Zellen über TLR4 und TLR2 vermittelt wird, sollte durch Stimulation immaturer DCs mit Überständen kommensal stimulierter DCs untersucht werden, ob sezernierte DC-Zytokine Signalwege zwischen DCs untereinander darstellen, um die I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCPIP1-Expression auch unabhängig von bakteriellem Kontakt zu beeinflussen und so innerhalb der DC-Population zu orchestrieren. Zwar vermuteten zurückliegende Studien autokrine oder parakrine Feedback-Loops im Rahmen der *B. vulgatus* mpk-induzierten DC-Semimaturation (Frick et al., 2006; Frick et al., 2010), in dieser Arbeit hatte die Stimulation von BMDCs allein mit Überständen *B. vulgatus* mpk- oder *E. coli* mpk-stimulierter DCs und den darin enthaltenen Zytokinen jedoch keinen sichtbaren Einfluss auf die Protein-Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  und MCPIP1. Nachweisen ließ sich nur ein Stimulus-unabhängiger Anstieg der Expression beider Proteine mit der Zeit. Hier könnte oxidativer Zell-Stress, den die DCs während der Stimulationszeit in Zellkultur erlebt haben könnten (Halliwell, 2003), eine mögliche Erklärung für den Zeit-abhängigen Anstieg der I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCPIP1-Expression darstellen (Qi et al., 2011; Chung et al., 2017).

In der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten beschrieben, wie I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCPIP1 in unterschiedlichen Zelltypen induziert werden können. So führt die Stimulation mit bakteriellem LPS sowohl zur Induktion der I $\kappa$ B $\zeta$ - (Yamazaki et al., 2001) als auch der MCPIP1-Expression (Liang et al., 2008). Aber auch diverse

andere TLR-Liganden können eine erhöhte Expression der beiden Proteine bewirken (Yamamoto et al., 2004; Blazusiak et al., 2013). Bezüglich der Induzierbarkeit von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  und MCPIP1 durch Zytokine finden sich verschiedene Angaben in der Fachliteratur. Tatsächlich konnte die Stimulation mit IL-6 alleine keine Veränderung der  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -Expression in T-Zellen (Okamoto et al., 2010) und keine Induktion der MCPIP1-Expression in Makrophagen (Jura et al., 2008) bewirken. Dies passt zu den Ergebnissen dieser Arbeit, die keine IL-6-Abhängigkeit der  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und MCPIP1-Expression in BMDCs nachweisen konnte. Damit scheint IL-6 auch in dendritischen Zellen keine entscheidende Rolle in der Regulation der Expression der beiden untersuchten Proteine einzunehmen. Für andere Zytokine, die zumindest in *E. coli* mpk-stimulierten DC-Überständen nachweisbar waren (s. Abb. 7), wie beispielsweise IL-1 $\beta$  ist jedoch sehr wohl eine  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - (Cardone et al., 2014) bzw. MCPIP1-induzierende Wirkung (Jura et al., 2008) vorbeschrieben, was eine Veränderung der Protein-Expressionen bei Stimulation mit den entsprechenden Stimulationslösungen erwarten ließe. Dass dies in den Versuchen dieser Studie ausblieb, könnte verschiedene Ursachen haben. So bleibt unter anderem das Zusammenspiel der verschiedenen in den Überständen enthaltenen Zytokine unklar. Da beispielsweise für IL-10, das ebenfalls in *E. coli* mpk-stimulierten DC-Überständen nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 7), eine hemmende Wirkung auf die  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -Expression in Makrophagen festgestellt wurde (Dagvadorj et al., 2009), könnten sich die Effekte der unterschiedlichen Zytokine auf die DCs gegenseitig beeinflussen oder aufheben und so in ihrer Gesamtheit zu keiner deutlich nachweisbaren Veränderung von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und MCPIP1-Expression führen. Als methodisches Problem käme darüber hinaus eine zu geringe Zytokin-Konzentration bei Stimulation mit 30 % der jeweiligen Überstandslösung infrage. Als Argument gegen letztere Hypothese kann jedoch sprechen, dass die Zytokin-Konzentrationen in *EC-ÜS* zumindest ausreichend waren, um einen signifikanten Einfluss auf die DC-Maturation zu haben (s. Abb. 13). Da der Anteil MHC-II<sup>hi</sup>-Zellen unabhängig von der Zugabe von anti-IL-6-Antikörper in beiden *EC-ÜS*-stimulierten Gruppen vergleichbar war, scheint IL-6 auch bezüglich der Maturation dendritischer Zellen keine wichtige Rolle einzunehmen. Tatsächlich

wurde in zurückliegenden Studien sogar über einen supprimierenden Effekt von IL-6 auf die Expression von MHC-II auf der Oberfläche dendritischer Zellen berichtet (Park et al., 2004; Ohno et al., 2016). Mitverantwortlich für die erhöhte DC-Maturation könnte aber TNF- $\alpha$  sein, der in hohen Konzentrationen in *EC-ÜS* gemessen werden konnte. Arbeiten anderer Forschungsgruppen konnten nach Stimulation von DCs mit TNF- $\alpha$  eine maximale Expression von Oberflächenmarkern wie MHC-II beobachten (Voigtländer et al., 2006) und auch *in vivo* zeigte sich eine verringerte Maturation von Colon-DCs in CED-Patienten unter anti-TNF- $\alpha$ -Therapie (Hart et al., 2005).

Mit Blick auf die Ergebnisse der TLR-Knockout-Experimente dieser Studie, in denen DC-Maturation und I $\kappa$ B $\zeta$ - bzw. MCPIP1-Induktion miteinander einhergingen, stellt sich nun die Frage, warum die DCs in diesem Versuch zwar, mutmaßlich TNF- $\alpha$ -vermittelt, maturierten, es jedoch zu keiner relevanten Induktion der untersuchten Proteine kam. Tatsächlich ist zumindest für TNF- $\alpha$  allein kein I $\kappa$ B $\zeta$ -induzierender Effekt beobachtet worden (Slowikowski et al., 2020). Auch wurde bereits mehrfach beschrieben, dass I $\kappa$ B $\zeta$  zwar durch TLR- und IL-1-Rezeptor-Liganden, nicht jedoch über den TNF-Rezeptor induziert werden kann (Yamamoto et al., 2004; Yamazaki et al., 2005; Seshadri et al., 2009). Eine TNF- $\alpha$ -vermittelte Erhöhung der MHC-II-Expression der DCs ohne gleichzeitige Erhöhung der I $\kappa$ B $\zeta$ -Level wäre in Einklang mit diesen Daten. Auf der anderen Seite wurde für IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in humanen Monozyten jedoch sehr wohl eine MCPIP1-induzierende Wirkung nachgewiesen (Liang et al., 2008). Es gilt allerdings zu beachten, dass die in jener Studie eingesetzte Konzentration an TNF- $\alpha$  ca. doppelt so hoch war wie die in dieser Arbeit in *EC-ÜS* bestimmte und eine Erhöhung des MCPIP1-Levels nur auf mRNA-Ebene beobachtet werden konnte (Liang et al., 2008). Möglicherweise wirkte sich im Rahmen des in dieser Arbeit durchgeführten Experimentes die geringere TNF- $\alpha$ -Konzentration so nur auf die DC-Maturation, nicht aber auf die MCPIP1-Expression aus oder die Unterschiede auf Protein-Ebene waren zu gering, um detektiert zu werden.

In Zusammenschau der in dieser Studie beobachteten Sachverhalte und der Datenlage in der Literatur scheinen bakteriell stimulierte dendritische Zellen die

I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCPIP1-Expression anderer DCs, die keinem bakteriellen Stimulus ausgesetzt waren, allein durch Zytokine zumindest *in vitro* unter den hier untersuchten Bedingungen nicht zu beeinflussen. Ein Einfluss auf die DC-Maturation nicht bakteriell stimulierter dendritischer Zellen, am ehesten vermittelt durch TNF- $\alpha$ , kann jedoch angenommen werden.

## 4.2 Einfluss kommensal induzierter DC-Zytokine auf die T-Zell-Differenzierung

Diese Arbeit konnte bereits zeigen, dass sich die von DCs nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk sezernierten Zytokin-Profile unterscheiden. Auch wenn sich diese nicht auf die I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCPIP1-Expression immaturer DCs auszuwirken scheinen, konnten die weiterführenden Experimente sehr wohl einen unterschiedlichen Effekt auf die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Effektor-T<sub>H</sub>-Zell-Subgruppen, für die wichtige Funktionen im Rahmen der CED-Pathogenese vermutet werden, aufdecken. So zeigte sich zum einen deutlich, dass Überstände bakteriell stimulierter DCs das Überleben der T-Zellen während der Polarisation signifikant verbessern. Die Art des bakteriellen Stimulus auf die DCs (*B. vulgatus* mpk oder *E. coli* mpk) spielt hierbei keine Rolle. Diesem Effekt könnten zum einen die nur in den Überständen bakteriell stimulierter DCs enthaltenen Zytokine (s. Abb. 7 & Kapitel 3.1.7) zugrunde liegen. Tatsächlich ist beispielsweise für sowohl in *BV*-ÜS als auch in *EC*-ÜS nachgewiesenes IL-6 eine Funktion als Überlebenssignal für T-Zellen vorbeschrieben (Ayroldi et al., 1998; Rochman et al., 2005). Darüber hinaus könnten ebenso in den DC-Überständen verbliebene bakterielle Bestandteile das T-Zell-Überleben positiv beeinflussen haben. Tatsächlich konnten Gelman et al. in einer zurückliegenden Studie einen positiven Einfluss bakterieller Bestandteile auf das Überleben aktivierter muriner T-Zellen feststellen. Dabei postulierten sie eine entscheidende Rolle von unter anderem CpG-DNA, einem für bakterielle Mikroorganismen typischen TLR9-Liganden (Hemmi et al., 2000), und konnten gleichzeitig kein verbessertes Überleben durch Stimulation mit einem TLR2- oder TLR4- Liganden

beobachten (Gelman et al., 2004). Unter der Prämisse, dass *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk ihre differentiellen immunogenen Eigenschaften vor allem durch Unterschiede in der Wirkung ihres jeweiligen LPS, eines TLR4-Liganden, vermitteln (Steimle et al., 2019; Michaelis et al., 2021), könnten die Erkenntnisse von Gelman et al. damit auch erklären, warum kein Unterschied im T-Zell-Überleben zwischen *BV-ÜS*- und *EC-ÜS*-stimulierter Gruppe zu erkennen war.

Auch die Analyse der T-Zell-Differenzierung unter dem Einfluss der DC-Zytokin-Profile offenbarte unter einzelnen Polarisationsbedingungen Stimulus-spezifische Unterschiede, vor allem bei 48 h andauernder Polarisation. So zeigte sich hier am deutlichsten, dass die Zytokine im Überstand *E. coli* mpk-stimulierter DCs zu den tendenziell höchsten Zahlen an T<sub>H</sub>1-Zellen führten. Dieser T-Zell-Subgruppe wird über ihr charakteristisches Zytokin Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) die Aktivierung der antimikrobiellen Aktivität von Makrophagen und damit eine wichtige Rolle in der Abwehr pathogener Mikroorganismen zugeschrieben (Zhu, 2018). Im klinischen Kontext konnte bereits mehrfach eine Assoziation zwischen erhöhten T<sub>H</sub>1-Zellen bzw. T<sub>H</sub>1-assoziierten Faktoren und Morbus Crohn nachgewiesen werden (Fuss et al., 1996; Neurath et al., 2002; Matsuoka et al., 2004; Olsen & Sollid, 2013; Di Giovangiulio et al., 2019). Auch bestimmte IFN- $\gamma$ -Polymorphismen konnten mit Morbus Crohn in Zusammenhang gebracht werden (Ebrahimi Daryani et al., 2019). Ein mit Morbus Crohn assoziierter *E. coli*-Stamm induzierte in Zellen aus mesenterialen Lymphknoten (MLN-Zellen) aus verschiedenen Maus-Colitis-Modellen eine T<sub>H</sub>1-Antwort, deren Stärke vom verwendeten Maus-Modell, also dem jeweiligen genetischen Hintergrund, abhängig war (Eun et al., 2014). Nachdem bereits frühere Studien einen T<sub>H</sub>1-induzierenden Effekt für *E. coli* mpk sowohl *in vitro* (Frick et al., 2006) als auch *in vivo* (Müller et al., 2008) nachweisen konnten, scheint diese Arbeit den pathobiontischen Charakter von *E. coli* mpk im Rahmen einer Induktion der T<sub>H</sub>1-Antwort zu bestätigen.

Die Zytokin-Zusammensetzung im Überstand *B. vulgatus* mpk-stimulierter DCs scheint im Gegensatz dazu nur zu geringen T<sub>H</sub>1-Zahlen zu führen. Vielmehr zeigen die Daten dieser Arbeit einen tendenziell T<sub>H</sub>2-induzierenden Effekt von *B. vulgatus* mpk-assoziierten Zytokinen. T<sub>H</sub>2-Zellen, deren charakteristisches

Zytokin IL-4 ist, nehmen physiologisch eine Rolle in der Immunabwehr gegenüber extrazellulären Parasiten und Würmern ein, eine pathologische Funktion wird dieser Subgruppe bei der Entstehung von allergischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale zugeschrieben (Zhu, 2018). Zwar konnten zurückliegende Untersuchungen speziell für *B. vulgatus* mpk weder *in vitro* (Frick et al., 2006) noch *in vivo* (Müller et al., 2008) eine gesteigerte IL-4-Expression als Zeichen eines T<sub>H</sub>2-Shifts feststellen. Für IL-6, das einzige der in dieser Arbeit untersuchten Zytokine, das von *B. vulgatus* mpk in der DC-Stimulation über *mock*-Level induziert wurde (s. Abb. 7), ist jedoch sowohl eine Suppression der T-Zell-Differenzierung in T<sub>H</sub>1-Richtung (Ohno et al., 2016) als auch eine Förderung der T<sub>H</sub>2-Differenzierung (Diehl & Rincón, 2002) vorbeschrieben. IL-6 könnte als entscheidendes Zytokin im Überstand *B. vulgatus* mpk-stimulierter DCs so die Differenzierung naiver T-Zellen zu T<sub>H</sub>2-Zellen gefördert haben. Die klinische Bedeutung dieses potentiellen Zusammenhangs zwischen *B. vulgatus* mpk, IL-6 und T<sub>H</sub>2-Zellen bleibt zunächst unklar. Für IL-6 an sich wurden jedoch protektive Effekte bezüglich der Entstehung einer Colitis im Maus-Modell beschrieben. So konnte eine Verstärkung der DC-abhängigen T-Zell-Aktivierung in IL-6-Knockout-Mäusen nachgewiesen werden (Park et al., 2004) und auch in IL-10-Knockout-Mäusen führte eine zusätzliche IL-6-Defizienz zu verschlimmelter Colitis-Symptomatik (Ye et al., 2019). Interessanterweise wurde von Ye et al. neben einer Suppression der T<sub>reg</sub>-Differenzierung auch eine Förderung der T<sub>H</sub>2-Entwicklung als Ursache der gesteigerten Inflammation in IL-10-Mäusen mit zusätzlicher IL-6-Defizienz angeführt (Ye et al., 2019). Letzteres widerspricht jedoch der von Diehl und Rincón postulierten T<sub>H</sub>2-induzierenden Wirkung von IL-6 (Diehl & Rincón, 2002). Auch in dieser Arbeit konnte mit hohen T<sub>H</sub>2-Zahlen in der nur mit DC-Medium scheinstimulierten *mock*-Gruppe ein unerwartetes Ergebnis beobachtet werden. Ob *B. vulgatus* mpk-induziertes IL-6 tatsächlich einen T<sub>H</sub>2-induzierenden Effekt vermittelt, gilt es daher in zukünftigen Studien zur TC-Polarisation, beispielsweise unter Verwendung IL-6-neutralisierender Antikörper oder mithilfe von IL-6-Rezeptor-Knockout-Modellen, genauer zu untersuchen.

Für die Gruppe der regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) lässt sich am ehesten für *B. vulgatus* mpk-assoziierte Zytokine ein induzierender Effekt feststellen, auch wenn im Experiment bei längerer Polarisation in allen Stimulationsgruppen die  $T_{reg}$ -Zahlen anstiegen.  $T_{reg}$ -Zellen wirken als wichtige Regulatoren unter anderem der intestinalen Immunbalance (Josefowicz et al., 2012). Bestandteile der intestinalen Mikrobiota, beispielsweise *Bacteroides fragilis*, und ihre Metabolite können über die Induktion von  $T_{reg}$ -Zellen und die damit verbundene gesteigerte Produktion von antiinflammatorischem IL-10 zur Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase beitragen (Round & Mazmanian, 2010; Round et al., 2011; Arpaia et al., 2013). Speziell für *B. vulgatus* mpk und sein isoliertes LPS ist bei Applikation im Rahmen eines *Rag1*<sup>-/-</sup>-Maus-Colitis-Modells ein Rückgang der Symptome mit einem gleichzeitigen Anstieg des  $T_{reg}$ -induzierenden Milieus beschrieben (Steimle et al., 2019), was die hier angenommene  $T_{reg}$ -Induktion durch Überstände *B. vulgatus* mpk-stimulierter DCs unterstützt.

Neben  $T_{reg}$ - spielen auch  $T_{H17}$ -Zellen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung einer adäquaten Immunabwehr, können jedoch ebenso pathogene Funktionen in der Entstehung von Erkrankungen wie CED ausüben (Stockinger & Omenetti, 2017). Nachdem im Experiment nur für einen Zeitpunkt tendenziell höhere  $T_{H17}$ -Zahlen in der BV-ÜS-stimulierten Gruppe nachgewiesen werden konnten, konnte die Analyse der in ihrer Funktion heterogenen  $T_{H17}$ -Subgruppen, die Einflüsse der untersuchten Zytokin-Profile auf die  $T_{H17}$ -Differenzierung näher charakterisieren.

So kann aus den Daten dieser Studie für IL-17<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> protektive  $T_{H17}$ -Zellen eine recht deutliche Induktion sowohl durch *B. vulgatus* mpk- als auch *E. coli* mpk-assoziierte DC-Zytokine abgeleitet werden. Die Umwandlung klassischer  $T_{H17}$ -Zellen in einen IL-10-sezernierenden, protektiven Phänotyp mit immunsuppressiver Wirkung ist *in vivo* als Methode vorbeschrieben, um proinflammatorische  $T_{H17}$ -Reaktionen zu limitieren (Esplugues et al., 2011). Insofern scheint es sinnvoll, dass DCs nach Kontakt mit dem stark immunogenen Stamm *E. coli* mpk (Maerz et al., 2019) ein die Differenzierung von  $T_{H17}$  in IL-17<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> protektive  $T_{H17}$  förderndes Zytokin-Profil sezernieren, um die durch *E. coli* mpk hervorgerufene starke Immunreaktion zu regulieren. Dass die

Polarisation mit den Überständen *B. vulgatus* mpk-stimulierter DCs sogar zu tendenziell noch höheren Zahlen protektiver TH17-Zellen führte, obwohl dieser schwach immunogene Stamm keine starken Immunreaktionen auslöst (Maerz et al., 2019), unterstreicht die symbiontischen Eigenschaften von *B. vulgatus* mpk in der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase.

Für die übrigen untersuchten TH17-Subgruppen lassen sich nur weniger eindeutige Schlussfolgerungen aus den hier gewonnenen Daten ziehen. So blieben die Zahlen der TH1-like TH17-Zellen unabhängig vom applizierten Zytokin-Profil ungefähr auf dem Ausgangslevel. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und mit bakteriellem Überstand stimulierten Gruppen nach maximaler Polarisationszeit scheint vielmehr durch einen stärkeren Abfall der TH1-like TH17-Zellen in den Kontrollen als durch eine Induktion dieser Zell-Gruppe durch Bakterien-assoziierte DC-Zytokine entstanden zu sein. TH1-like TH17-Zellen exprimieren neben IL-17 auch das eigentlich für TH1-Zellen typische IFN- $\gamma$  (Bending et al., 2009). Ihnen wird eine Rolle in der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen zugeschrieben (Kamali et al., 2019). Auch im Darm von Morbus Crohn-Patienten konnte diese TH17-Subgruppe nachgewiesen werden (Annunziato et al., 2007) und könnte folglich an der CED-Entstehung beteiligt sein (Harbour et al., 2015). Für die in dieser Studie verwendeten Modell-Kommensalen lässt sich jedoch kein eindeutiger TH1-like TH17-induzierender Effekt über DC-Zytokine feststellen.

Auch für die Gruppe der anti-TH17-T<sub>reg</sub>-Zellen ließ sich im Experiment nur tendenziell eine Induktion durch *E. coli* mpk-assoziierte DC-Zytokine erkennen. IL-17<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> anti-TH17-T<sub>reg</sub>-Zellen sind in Gesunden kaum nachweisbar, konnten allerdings in der entzündeten Mukosa von Morbus Crohn-Patienten beobachtet werden (Hovhannisyanyan et al., 2011; Ueno et al., 2013). Die Konversion von T<sub>reg</sub>- in anti-TH17-T<sub>reg</sub>-Zellen kann durch TLR2-Signale gefördert werden (Nyirenda et al., 2011) und auch für die Kombination der Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$  und IL-23 ist eine induzierende Wirkung für diese TH17-Subgruppe nachgewiesen (Ueno et al., 2013). Da sowohl die genannten Zytokine als auch TLR2-Liganden im Überstand *E. coli* mpk-stimulierter DCs zu erwarten sind, scheint eine Induktion von anti-TH17-T<sub>reg</sub>-Zellen durch diesen Stimulus

theoretisch möglich. Funktionell behalten anti-T<sub>H</sub>17-T<sub>reg</sub>-Zellen ihre immunregulierenden, suppressiven Eigenschaften (Voo et al., 2009; Hovhannisyanyan et al., 2011) und könnten damit auch in der Regulation von *E. coli* mpk-induzierter Immunaktivität mitwirken.

Zusammenfassend können die Daten dieser Studie die vorbeschriebene Rolle von *E. coli* mpk als Pathobiont bzw. *B. vulgatus* mpk als Symbiont bestätigen. So führte das Zytokin-Profil *B. vulgatus* mpk-stimulierter DCs eher zur Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen in protektive T<sub>H</sub>-Subgruppen als *E. coli* mpk-assoziierte Zytokine. Da im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden konnte, dass die unterschiedliche Zytokin-Sekretion der DCs mit differentieller I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCPIP1-Expression einhergeht, liegt ein Zusammenhang hier nahe. Bewiesen werden muss dieser jedoch in weiterführenden Experimenten, in denen beispielsweise über Knockout der beiden Proteine ihr jeweiliger Einfluss auf DC-vermittelte Zytokin-Sekretion und daraus resultierende T-Zell-Differenzierung genauer charakterisiert wird.

### 4.3 I $\kappa$ B $\zeta$ und MCPIP1 in intestinalen Epithelzellen

Nachdem die Daten dieser Studie eine wichtige Funktion von I $\kappa$ B $\zeta$  und MCPIP1 im Rahmen der Mikrobiota/Immunsystem-Interaktion nahelegen, konnte in einem abschließenden Experiment die Relevanz dieser Proteine für intestinale Epithelzellen, die mit der intestinalen Mikrobiota in noch engerem Kontakt stehen als DCs, besser charakterisiert werden. Für die Untersuchung intestinaler Epithelzellen *in vitro* stehen dabei verschiedene Zell-Linien zur Verfügung (Pearce et al., 2018). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zell-Linie mIC<sub>cl2</sub> ist ursprünglich von murinen Dünndarm-Krypten-Zellen abgeleitet worden. In Zellkultur stellen mIC<sub>cl2</sub>-Zellen nicht nur polarisierte Epithelzellen dar, sondern bilden Monolayer mit rudimentärem Bürstensaum und zum Teil damit assoziierten Enzymen aus. mIC<sub>cl2</sub>-Zellkulturen sind damit durchaus realistische Modelle für das intestinale Epithel und insbesondere für

Untersuchungen bezüglich der Interaktion zwischen Mikroorganismen und Epithelzellen geeignet. (Bens et al., 1996)

Im Rahmen der mit diesen Zellen durchgeführten Stimulationsversuche konnte diese Studie zeigen, dass intestinale Kommensale nicht nur in DCs, sondern auch in murinen intestinalen Epithelzellen die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  (Michaelis et al., 2021) und MCP1 auf unterschiedliche Art und Weise beeinflussen. So führte auch in Epithelzellen die Stimulation mit *E. coli* mpk zu einer wesentlich stärkeren Induktion der I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCP1-Expression als die *B. vulgatus* mpk-Stimulation. Beim Vergleich der Stimulation von mIC<sub>cl2</sub>-Zellen mit den Daten, die im Rahmen der DC-Stimulationen generiert wurden (s. Abb. 6 A), fällt jedoch bezüglich der mRNA-Expression der untersuchten Gene auf, dass obwohl die Stimulation der Epithelzellen mit einer zehnfach höheren MOI erfolgte, hier wesentlich geringere Level an I $\kappa$ B $\zeta$ - und auch MCP1-mRNA zu beobachten waren als bei Stimulation von DCs. Dies verdeutlicht die unterschiedliche Funktion von Epithelzellen und den professionell Antigen-präsentierenden DCs.

Um die Mechanismen, die der unterschiedlichen Responsivität auf die verwendeten Bakterien in DCs und mIC<sub>cl2</sub>-Zellen eventuell zugrunde liegen, erläutern zu können, muss zunächst beachtet werden, dass auch mIC<sub>cl2</sub>-Epithelzellen unter anderem TLR2 und TLR4 exprimieren und eine deutliche Reaktion dieser Zelllinie auf die Stimulation mit LPS hin vorbeschrieben wurde (Hornef et al., 2002; van Aubele et al., 2007). Günther et al. postulierten, dass TLRs in vielen Epithelzellen jedoch in niedrigerer Ausprägung als in Immunzellen exprimiert werden und in diesem Zelltyp auch die Lokalisation der TLRs wichtig für den Kontakt zu Mikroorganismen sei (Günther & Seyfert, 2018). So kann eine überwiegend basolaterale Lage der TLRs einen übermäßigen Antigen-Kontakt der Rezeptoren vermeiden, was für TLR2 und TLR4 in intestinalen Epithelzellen beobachtet wurde (Fusunyan et al., 2001). Interessanterweise wurde in Morbus Crohn-Patienten hingegen eine verstärkt apikale Lage von TLR4 nachgewiesen, was die Relevanz der TLR-Lokalisation für die Aufrechterhaltung der Homöostase verdeutlicht (Cario & Podolsky, 2000). Schutzmechanismen vor übermäßiger TLR-Aktivierung sind auch für mIC<sub>cl2</sub>-Zellen vorbeschrieben. So

wurde für TLR4 in diesen Zellen eine strikt intrazelluläre Lokalisation berichtet, was eine Internalisierung des LPS vor Induktion einer entsprechenden Immunreaktion notwendig macht und somit zum Schutz vor unkontrollierter Stimulation der Epithelzellen, die *in vivo* schließlich ständig mit einer hohen Zahl von Mikroorganismen konfrontiert sind, dient (Hornef et al., 2002; Hornef et al., 2003).

Diese Notwendigkeit der Internalisierung des LPS für die adäquate Stimulierung von TLR4 kann auch als Erklärung für die Kinetik, die im Rahmen der Analyse der I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCPIP1-Protein-Expression beobachtet werden konnte, gesehen werden. So stieg sowohl der I $\kappa$ B $\zeta$ - als auch der MCPIP1-Protein-Level erst nach 2 h Stimulation an. Unterstützt wird diese Erklärung auch dadurch, dass die Phagosom-Bildung im Rahmen der Phagozytose bei Epithelzellen deutlich langsamer abläuft als in professionell Antigen-präsentierenden Zellen (Günther & Seyfert, 2018), was die Zeit bis zur adäquaten Aktivierung des intrazellulären TLR4 weiter verlängert haben dürfte. Bezüglich der Kinetik der I $\kappa$ B $\zeta$ - und MCPIP1-Expression in mIC<sub>cl2</sub>-Zellen im Vergleich zu WT-DCs (s. Abb. 10 B) war ebenfalls auffällig, dass es nur nach 2 h Stimulation zu einem kurzen Anstieg der Protein-Spiegel in *E. coli* mpk-stimulierten Zellen kam, die Expression anschließend aber wieder auf das ursprüngliche Niveau absank und in MCPIP1 nach maximaler Stimulationszeit sogar signifikant gegenüber der unstimulierten Kontrolle verringert war. Hier könnte eine mögliche Toleranzentwicklung der Epithelzellen im Laufe der Stimulation ursächlich sein, da dies gerade für intestinale Epithelzellen, die in ständigem Kontakt zu zahlreichen Mikroorganismen stehen, als wichtiger Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Homöostase dienen könnte. Tatsächlich konnten van Aubel et al. bei langer Stimulation von mIC<sub>cl2</sub>-Zellen mit LPS eine Herabregulation von TLR4-mRNA nachweisen und interpretierten dies als negativen Feedback-Mechanismus zum Schutz vor bakterieller Überstimulation (van Aubel et al., 2007). Auch Hornef et al. berichteten bei dauerhafter LPS-Stimulation von der Ausbildung eines toleranten Phänotyps der mIC<sub>cl2</sub>-Zellen, wobei sie hierbei jedoch keine Veränderung der TLR4-Expression feststellen konnten (Hornef et al., 2002). Im Widerspruch zur Hypothese, dass TLR-Herabregulation für den schnellen Abfall der Protein-Expression nach 2 h in mIC<sub>cl2</sub>-Zellen verantwortlich sein könnte, steht

auch die Tatsache, dass selbst nach 4 h Stimulation noch deutlich erhöhte Level an  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ - und MCPIP1-mRNA im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle in *E. coli* mpk-stimulierten Zellen nachgewiesen werden konnten. Daher könnte der Regulation der Protein-Expression auch ein anderer Mechanismus zugrunde liegen, den es in weiteren Versuchen genauer zu charakterisieren gilt.

Abschließend soll auf die Rolle von MCPIP1 in Epithelzellen näher eingegangen werden, da hierzu unterschiedliche Angaben in der Literatur vorliegen. Klassischerweise gilt MCPIP1 als Immunregulator und wird als Feedback-Inhibitor überschießender Immunreaktionen beschrieben (Liang et al., 2008; Garg et al., 2015). Auch für Epithelien, in denen MCPIP1 konstitutiv und in manchen Epithelzell-Typen sogar stärker als in Makrophagen oder DCs exprimiert wird, wird MCPIP1 eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Homöostase zugeschrieben (Dobosz et al., 2016). Neuere Untersuchungen von Nagahama et al. berichteten im Gegensatz dazu von einer protektiven Funktion einer intestinalen MCPIP1-Defizienz gegenüber DSS-induzierter Colitis im Maus-Modell und postulierten eine negative Rolle von MCPIP1 bezüglich der Effektivität der intestinalen Barriere und der Regeneration des Epithels nach Inflammation (Nagahama et al., 2018). Darüber hinaus konnten sie auch eine verringerte Progression von chronischer Colitis und kolorektalen Tumoren bei intestinaler MCPIP1-Defizienz feststellen (Nagahama et al., 2018). Interessanterweise führen Dobosz et al. als Mechanismus der anti-inflammatorischen Wirkung von MCPIP1 in Epithelien eine verminderte Expression von unter anderem IL-6 bei hohen MCPIP1-Leveln an (Dobosz et al., 2016). Eine neuere Studie konnte hingegen eine Exazerbation der Colitis in IL-10-Mäusen mit zusätzlicher IL-6-Defizienz nachweisen, was eine intestinal protektive Rolle von IL-6 nahelegt (Ye et al., 2019). Zusammenfassend ist die Datenlage bezüglich der Rolle von MCPIP1 in Epithelien teilweise widersprüchlich. Weitere Arbeiten müssen hier neue Erkenntnisse beitragen. Auch bezüglich der Rolle von IL-6 in diesem Zusammenhang und inwiefern sich *B. vulgatus* mpk als IL-6-induzierendes Bakterium hierbei protektiv auswirken kann, lässt der Stand der Forschung aktuell noch keine abschließenden Aussagen zu.

## 4.4 Schlussfolgerungen

In Zusammenschau der Erkenntnisse aus dieser Arbeit mit der vorhandenen Literatur scheinen die Proteine I $\kappa$ B $\zeta$  und MCPIP1 eine relevante Funktion in der Steuerung von Immunreaktionen in Zellen des angeborenen intestinalen Immunsystems wie dendritischen Zellen oder intestinalen Epithelzellen zu haben und beispielsweise durch Veränderung der Zytokin-Sekretion Einfluss auf nachgeschaltete Elemente des adaptiven Immunsystems wie T<sub>H</sub>17-Zellen zu nehmen. Ihre eigene Expression kann hierbei TLR-vermittelt durch die intestinale Mikrobiota reguliert werden, wobei symbiotische Kommensalen immunregulierend und protektiv bezüglich der induzierten Immunreaktionen zu wirken scheinen. I $\kappa$ B $\zeta$  und MCPIP1 könnten damit, beeinflusst durch die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota, Regulatoren für Elemente des Immunsystems, die auch in der CED-Pathogenese von Bedeutung sind, darstellen. Eine veränderte Funktion dieser Proteine im Rahmen einer intestinalen Dysbiose könnte zur Pathogenese von CED beitragen.

Als *in vitro*-Studie mit murinen Zellen kann diese Arbeit somit erste Hinweise auf eine Beteiligung von I $\kappa$ B $\zeta$  und MCPIP1 in Pathomechanismen gestörter intestinaler Immunreaktionen geben. Für die Beurteilung der tatsächlichen Relevanz der Proteine in CED beim Menschen müssen die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch in *in vivo*-Studien und Versuchen mit humanen Zellen bestätigt und ergänzt werden. Dann könnten, nachdem für andere Erkrankungen bereits mit I $\kappa$ B $\zeta$ -modulierenden Therapeutika geforscht wird, Mikrobiota-assoziierte Therapieverfahren zur Manipulation von I $\kappa$ B $\zeta$  oder MCPIP1 neue Möglichkeiten darstellen, um die Therapieoptionen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Zukunft zu ergänzen.

## 5 Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) können bei betroffenen Patienten zu deutlichen Einschränkungen der Lebensqualität und teils schwerwiegenden Komplikationen führen. Trotz intensiver Forschung sind die zugrundeliegenden Pathomechanismen nicht vollständig aufgeklärt. CED können, wie viele andere Erkrankungen, mit einer ungünstigen Veränderung der intestinalen Mikrobiota, einer Dysbiose, einhergehen. Auch dendritischen Zellen (DCs) und insbesondere T<sub>H</sub>17-Zellen wird als wichtigen Elementen des intestinalen Immunsystems eine Rolle in der CED-Pathogenese zugesprochen.

Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe des Symbionten *Bacteroides vulgatus* mpk und des Pathobionten *Escherichia coli* mpk als Modell-Kommensalen den Einfluss der intestinalen Mikrobiota auf die Expression des im Rahmen der T<sub>H</sub>17-Antwort wichtigen Proteins I $\kappa$ B $\zeta$ , des I $\kappa$ B $\zeta$ -regulierenden Proteins MCPIP1 und auf nachgeschaltete Immunreaktionen zu charakterisieren.

In Stimulationsversuchen mit murinen Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  und MCPIP1 sowohl in DCs als auch in intestinalen Epithelzellen durch Kommensalen in Abhängigkeit von ihrer Immunogenität unterschiedlich beeinflusst wird. Während die Stimulation mit *E. coli* mpk zu deutlicher Induktion dieser Proteine und Sekretion T<sub>H</sub>17-induzierender Zytokine durch DCs führte, wirkte sich der Kontakt mit *B. vulgatus* mpk immunregulierend aus, was sich in geringerer Expression der untersuchten Proteine und verminderter Sekretion von T<sub>H</sub>17-Zytokinen widerspiegelte. Als entscheidende Elemente der Signalwege, die die unterschiedlichen Effekte der Kommensalen auf DCs vermittelten, konnten Toll-like Rezeptoren (TLR), insbesondere TLR4, identifiziert werden. Im Rahmen eines T-Zell-Polarisations-Assays zeigte sich schließlich, dass auch die Differenzierung naiver T-Zellen durch *B. vulgatus* mpk-induzierte DC-Zytokine stärker in Richtung protektiver T<sub>H</sub>-Subgruppen gelenkt wurde als durch *E. coli* mpk-induzierte DC-Zytokine.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die differentielle Induktion von I $\kappa$ B $\zeta$  und MCPIP1 insbesondere in DCs eine wichtige Rolle in der Regulation

von Mikrobiota-assoziierten Immunreaktionen wie der T-Zell-Antwort einnimmt. Nachdem bereits in zurückliegenden Studien Hinweise auf eine Beteiligung beider Proteine in der Pathogenese von CED gefunden wurden, unterstützen die Erkenntnisse dieser Arbeit die Hypothese, dass eine bei intestinaler Dysbiose veränderte Funktion von I $\kappa$ B $\zeta$  und MCP1 an der Entstehung von CED beteiligt sein kann. Als Ansatzpunkte für die weiterführende Forschung an neuen, Mikrobiota-assoziierten Therapieverfahren können die hier dargestellten Zusammenhänge somit einen Beitrag dazu leisten, die Behandlungsmöglichkeiten für CED-Patienten in Zukunft zu erweitern.

## 6 Literaturverzeichnis

- ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V., NAPOLITANI, G., LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F. (2007). Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*, 8(9): 942-949.
- ADAMS, J. B., JOHANSEN, L. J., POWELL, L. D., QUIG, D. & RUBIN, R. A. (2011). Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol*, 11: 22.
- AKIRA, S., UEMATSU, S. & TAKEUCHI, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4): 783-801.
- ALIPRANTIS, A. O., YANG, R. B., MARK, M. R., SUGGETT, S., DEVAUX, B., RADOLF, J. D., KLIMPEL, G. R., GODOWSKI, P. & ZYCHLINSKY, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*, 285(5428): 736-739.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12(4): 205-217.
- ANNEMANN, M., PLAZA-SIRVENT, C., SCHUSTER, M., KATSOULIS-DIMITRIOU, K., KLICHE, S., SCHRAVEN, B. & SCHMITZ, I. (2016). Atypical IκB proteins in immune cell differentiation and function. *Immunol Lett*, 171: 26-35.
- ANNUNZIATO, F., COSMI, L., SANTARLASCI, V., MAGGI, L., LIOTTA, F., MAZZINGHI, B., PARENTE, E., FILÌ, L., FERRI, S., FROSALI, F., GIUDICI, F., ROMAGNANI, P., PARRONCHI, P., TONELLI, F., MAGGI, E. & ROMAGNANI, S. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*, 204(8): 1849-1861.
- ARPAIA, N., CAMPBELL, C., FAN, X., DIKIY, S., VAN DER VEEKEN, J., DEROOS, P., LIU, H., CROSS, J. R., PFEFFER, K., COFFER, P. J. & RUDENSKY, A. Y. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504(7480): 451-455.
- AYROLDI, E., ZOLLO, O., CANNARILE, L., F, D. A., GROHMANN, U., DELFINO, D. V. & RICCARDI, C. (1998). Interleukin-6 (IL-6) prevents activation-induced cell death: IL-2-independent inhibition of Fas/fasL expression and cell death. *Blood*, 92(11): 4212-4219.
- BAMBOUSKOVA, M., GORVEL, L., LAMPROPOULOU, V., SERGUSHICHEV, A., LOGINICHEVA, E., JOHNSON, K., KORENFELD, D., MATHYER, M. E., KIM, H., HUANG, L.-H., DUNCAN, D., BREGMAN, H., KESKIN, A., SANTEFORD, A., APTE, R. S., SEHGAL, R., JOHNSON, B., AMARASINGHE, G. K., SOARES, M. P., SATOH, T., AKIRA, S., HAI, T., DE GUZMAN STRONG, C., AUCLAIR, K., RODDY, T. P., BILLER, S. A., JOVANOVIĆ, M., KLECHEVSKY, E., STEWART, K. M., RANDOLPH, G. J. & ARTYOMOV, M. N. (2018). Electrophilic properties of itaconate and derivatives regulate the IκBζ–ATF3 inflammatory axis. *Nature*, 556(7702): 501-504.

- BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673): 245-252.
- BAUMGART, D. C., METZKE, D., GUCKELBERGER, O., PASCHER, A., GRÖTZINGER, C., PRZESDZING, I., DÖRFFEL, Y., SCHMITZ, J. & THOMAS, S. (2011). Aberrant plasmacytoid dendritic cell distribution and function in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol*, 166(1): 46-54.
- BAUMGART, D. C. & SANDBORN, W. J. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*, 369(9573): 1641-1657.
- BAUMGART, D. C., THOMAS, S., PRZESDZING, I., METZKE, D., BIELECKI, C., LEHMANN, S. M., LEHNARDT, S., DÖRFFEL, Y., STURM, A., SCHEFFOLD, A., SCHMITZ, J. & RADBRUCH, A. (2009). Exaggerated inflammatory response of primary human myeloid dendritic cells to lipopolysaccharide in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*, 157(3): 423-436.
- BEAUGERIE, L., SVRCEK, M., SEKSIK, P., BOUVIER, A. M., SIMON, T., ALLEZ, M., BRIXI, H., GORNET, J. M., ALTWEGG, R., BEAU, P., DUCLOS, B., BOURREILLE, A., FAIVRE, J., PEYRIN-BIROULET, L., FLÉJOU, J. F. & CARRAT, F. (2013). Risk of colorectal high-grade dysplasia and cancer in a prospective observational cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 145(1): 166-175.e168.
- BENCHIMOL, E. I., MACK, D. R., GUTTMANN, A., NGUYEN, G. C., TO, T., MOJAVERIAN, N., QUACH, P. & MANUEL, D. G. (2015). Inflammatory bowel disease in immigrants to Canada and their children: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol*, 110(4): 553-563.
- BENDING, D., DE LA PEÑA, H., VELDHOEN, M., PHILLIPS, J. M., UYTENHOVE, C., STOCKINGER, B. & COOKE, A. (2009). Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J Clin Invest*, 119(3): 565-572.
- BENS, M., BOGDANOVA, A., CLUZEAUD, F., MIQUEROL, L., KERNEIS, S., KRAEHENBUHL, J. P., KAHN, A., PRINGAULT, E. & VANDEWALLE, A. (1996). Transimmortalized mouse intestinal cells (m-ICc12) that maintain a crypt phenotype. *Am J Physiol*, 270(6 Pt 1): C1666-1674.
- BERNARDO, D., CHAPARRO, M. & GISBERT, J. P. (2018). Human Intestinal Dendritic Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Mol Nutr Food Res*, 62(7): e1700931.
- 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(7090): 235-238.
- BLAZUSIAK, E., FLORCZYK, D., JURA, J., POTEMPA, J. & KOZIEL, J. (2013). Differential regulation by Toll-like receptor agonists reveals that MCP1 is the potent regulator of innate immunity in bacterial and viral infections. *J Innate Immun*, 5(1): 15-23.

- BOKEMEYER, B., HARDT, J., HÜPPE, D., PRENZLER, A., CONRAD, S., DÜFFELMEYER, M., HARTMANN, P., HOFFSTADT, M., KLUGMANN, T., SCHMIDT, C., WEISMÜLLER, J., MITTENDORF, T. & RASPE, H. (2013). Clinical status, psychosocial impairments, medical treatment and health care costs for patients with inflammatory bowel disease (IBD) in Germany: an online IBD registry. *J Crohns Colitis*, 7(5): 355-368.
- BRITTON, G. J., CONTIJOCH, E. J., MOGNO, I., VENNARO, O. H., LLEWELLYN, S. R., NG, R., LI, Z., MORTHA, A., MERAD, M., DAS, A., GEVERS, D., MCGOVERN, D. P. B., SINGH, N., BRAUN, J., JACOBS, J. P., CLEMENTE, J. C., GRINSPAN, A., SANDS, B. E., COLOMBEL, J. F., DUBINSKY, M. C. & FAITH, J. J. (2019). Microbiotas from Humans with Inflammatory Bowel Disease Alter the Balance of Gut Th17 and ROR $\gamma$ t(+) Regulatory T Cells and Exacerbate Colitis in Mice. *Immunity*, 50(1): 212-224.e214.
- CARDONE, M., DZUTSEV, A. K., LI, H., RITEAU, N., GEROSA, F., SHENDEROV, K., WINKLER-PICKETT, R., PROVEZZA, L., RIBOLDI, E., LEIGHTY, R. M., ORR, S. J., STEINHAGEN, F., WEWERS, M. D., SHER, A., ANDERSON, S. K., GOLDSZMID, R., MCVICAR, D. W., LYAKH, L. & TRINCHIERI, G. (2014). Interleukin-1 and interferon-gamma orchestrate beta-glucan-activated human dendritic cell programming via I $\kappa$ B-zeta modulation. *PLoS One*, 9(12): e114516.
- CARIO, E. & PODOLSKY, D. K. (2000). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*, 68(12): 7010-7017.
- CARUSO, R., LO, B. C. & NÚÑEZ, G. (2020). Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 20(7): 411-426.
- CHOW, J. C., YOUNG, D. W., GOLENBOCK, D. T., CHRIST, W. J. & GUSOVSKY, F. (1999). Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*, 274(16): 10689-10692.
- CHUNG, K. W., JEONG, H. O., LEE, B., PARK, D., KIM, D. H., CHOI, Y. J., LEE, E. K., KIM, K. M., PARK, J. W., YU, B. P. & CHUNG, H. Y. (2017). Involvement of NF- $\kappa$ B and related cytokines in age-associated renal fibrosis. *Oncotarget*, 8(5): 7315-7327.
- CONTI, H. R., SHEN, F., NAYYAR, N., STOCUM, E., SUN, J. N., LINDEMANN, M. J., HO, A. W., HAI, J. H., YU, J. J., JUNG, J. W., FILLER, S. G., MASSO-WELCH, P., EDGERTON, M. & GAFFEN, S. L. (2009). Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med*, 206(2): 299-311.
- DAGVADORJ, J., NAIKI, Y., TUMURKHUU, G., NOMAN, A. S., IFTEKAR, E. K. I., KOIDE, N., KOMATSU, T., YOSHIDA, T. & YOKOCHI, T. (2009). Interleukin (IL)-10 attenuates lipopolysaccharide-induced IL-6 production via inhibition of I $\kappa$ B-zeta activity by Bcl-3. *Innate Immun*, 15(4): 217-224.
- DI GIOVANGIULIO, M., RIZZO, A., FRANZÈ, E., CAPRIOLI, F., FACCIOTTI, F., ONALI, S., FAVALE, A., STOLFI, C., FEHLING, H. J., MONTELEONE, G. & FANTINI, M. C. (2019). Tbet Expression in Regulatory T Cells Is Required to Initiate Th1-Mediated Colitis. *Front Immunol*, 10: 2158.

- DIEHL, S. & RINCÓN, M. (2002). The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol*, 39(9): 531-536.
- DOBOSZ, E., WILAMOWSKI, M., LECH, M., BUGARA, B., JURA, J., POTEMPA, J. & KOZIEL, J. (2016). MCP-1, Alias Regnase-1, Controls Epithelial Inflammation by Posttranscriptional Regulation of IL-8 Production. *J Innate Immun*, 8(6): 564-578.
- EBRAHIMI DARYANI, N., SADR, M., SOLTANI, S., SAGHAZADEH, A., MOOSSAVI, S., SHAHKARAMI, S., FARHADI, E. & REZAEI, N. (2019). Association of T Helper 1 Cytokine Gene Single Nucleotide Polymorphisms with Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Dig Dis*, 37(1): 21-32.
- ECKBURG, P. B., BIK, E. M., BERNSTEIN, C. N., PURDOM, E., DETHLEFSEN, L., SARGENT, M., GILL, S. R., NELSON, K. E. & RELMAN, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728): 1635-1638.
- EL AIDY, S., VAN BAARLEN, P., DERRIEN, M., LINDENBERGH-KORTLEVE, D. J., HOOVELD, G., LEVENEZ, F., DORÉ, J., DEKKER, J., SAMSOM, J. N., NIEUWENHUIS, E. E. & KLEEREBEZEM, M. (2012). Temporal and spatial interplay of microbiota and intestinal mucosa drive establishment of immune homeostasis in conventionalized mice. *Mucosal Immunol*, 5(5): 567-579.
- ESPLUGUES, E., HUBER, S., GAGLIANI, N., HAUSER, A. E., TOWN, T., WAN, Y. Y., O'CONNOR, W., JR., RONGVAUX, A., VAN ROOIJEN, N., HABERMAN, A. M., IWAKURA, Y., KUCHROO, V. K., KOLLS, J. K., BLUESTONE, J. A., HEROLD, K. C. & FLAVELL, R. A. (2011). Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature*, 475(7357): 514-518.
- EUN, C. S., MISHIMA, Y., WOHLGEMUTH, S., LIU, B., BOWER, M., CARROLL, I. M. & SARTOR, R. B. (2014). Induction of bacterial antigen-specific colitis by a simplified human microbiota consortium in gnotobiotic interleukin-10<sup>-/-</sup> mice. *Infect Immun*, 82(6): 2239-2246.
- FARACHE, J., KOREN, I., MILO, I., GUREVICH, I., KIM, K. W., ZIGMOND, E., FURTADO, G. C., LIRA, S. A. & SHAKHAR, G. (2013). Luminal bacteria recruit CD103<sup>+</sup> dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. *Immunity*, 38(3): 581-595.
- FEAGAN, B. G., SANDBORN, W. J., GASINK, C., JACOBSTEIN, D., LANG, Y., FRIEDMAN, J. R., BLANK, M. A., JOHANNIS, J., GAO, L. L., MIAO, Y., ADEDOKUN, O. J., SANDS, B. E., HANAUER, S. B., VERMEIRE, S., TARGAN, S., GHOSH, S., DE VILLIERS, W. J., COLOMBEL, J. F., TULASSAY, Z., SEIDLER, U., SALZBERG, B. A., DESREUMAUX, P., LEE, S. D., LOFTUS, E. V., JR., DIELEMAN, L. A., KATZ, S. & RUTGEERTS, P. (2016). Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *N Engl J Med*, 375(20): 1946-1960.
- FITZGERALD, K. A. & KAGAN, J. C. (2020). Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*, 180(6): 1044-1066.
- FONTENOT, J. D., GAVIN, M. A. & RUDENSKY, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4(4): 330-336.

- FRANK, D. N., ST AMAND, A. L., FELDMAN, R. A., BOEDEKER, E. C., HARPAZ, N. & PACE, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(34): 13780-13785.
- FRICK, J. S., GRUNEBACH, F. & AUTENRIETH, I. B. (2010). Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *Int J Med Microbiol*, 300(1): 19-24.
- FRICK, J. S., ZAHIR, N., MÜLLER, 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(6): 1537-1547.
- FU, M. & BLACKSHEAR, P. J. (2017). RNA-binding proteins in immune regulation: a focus on CCCH zinc finger proteins. *Nat Rev Immunol*, 17(2): 130-143.
- FUSS, I. J., NEURATH, M., BOIRIVANT, M., KLEIN, J. S., DE LA MOTTE, 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(3): 1261-1270.
- FUSUNYAN, R. D., NANTHAKUMAR, N. N., BALDEON, M. E. & WALKER, W. A. (2001). Evidence for an innate immune response in the immature human intestine: toll-like receptors on fetal enterocytes. *Pediatr Res*, 49(4): 589-593.
- GARG, A. V., AMATYA, N., CHEN, K., CRUZ, J. A., GROVER, P., WHIBLEY, N., CONTI, H. R., HERNANDEZ MIR, G., SIRAKOVA, T., CHILDS, E. C., SMITHGALL, T. E., BISWAS, P. S., KOLLS, J. K., MCGEACHY, M. J., KOLATTUKUDY, P. E. & GAFFEN, S. L. (2015). MCP1 Endoribonuclease Activity Negatively Regulates Interleukin-17-Mediated Signaling and Inflammation. *Immunity*, 43(3): 475-487.
- GELMAN, A. E., ZHANG, J., CHOI, Y. & TURKA, L. A. (2004). Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *J Immunol*, 172(10): 6065-6073.
- GEVERS, D., KUGATHASAN, S., DENSON, L. A., VÁZQUEZ-BAEZA, Y., VAN TREUREN, W., REN, B., SCHWAGER, E., KNIGHTS, D., SONG, S. J., YASSOUR, M., MORGAN, X. C., KOSTIC, A. D., LUO, C., GONZÁLEZ, A., MCDONALD, D., HABERMAN, Y., WALTERS, T., BAKER, S., ROSH, J., STEPHENS, M., HEYMAN, M., MARKOWITZ, J., BALDASSANO, R., GRIFFITHS, A., SYLVESTER, F., MACK, D., KIM, S., CRANDALL, W., HYAMS, J., HUTTENHOWER, C., KNIGHT, R. & XAVIER, R. J. (2014). The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe*, 15(3): 382-392.
- GÜNTHER, J. & SEYFERT, H. M. (2018). The first line of defence: insights into mechanisms and relevance of phagocytosis in epithelial cells. *Semin Immunopathol*, 40(6): 555-565.

- HALFVARSON, J., BRISLAWN, C. J., LAMENDELLA, R., VÁZQUEZ-BAEZA, Y., WALTERS, W. A., BRAMER, L. M., D'AMATO, M., BONFIGLIO, F., MCDONALD, D., GONZALEZ, A., MCCLURE, E. E., DUNKLEBARGER, M. F., KNIGHT, R. & JANSSON, J. K. (2017). Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol*, 2: 17004.
- HALLIWELL, B. (2003). Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Lett*, 540(1-3): 3-6.
- HARBOUR, S. N., MAYNARD, C. L., ZINDL, C. L., SCHOEB, T. R. & WEAVER, C. T. (2015). Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(22): 7061-7066.
- HART, A. L., AL-HASSI, H. O., RIGBY, R. J., BELL, S. J., EMMANUEL, A. V., KNIGHT, S. C., KAMM, M. A. & STAGG, A. J. (2005). Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 129(1): 50-65.
- HAYES, C. L., DONG, J., GALIPEAU, H. J., JURY, J., MCCARVILLE, J., HUANG, X., WANG, X. Y., NAIDOO, A., ANBAZHAGAN, A. N., LIBERTUCCI, J., SHERIDAN, C., DUDEJA, P. K., BOWDISH, D. M. E., SURETTE, M. G. & VERDU, E. F. (2018). Commensal microbiota induces colonic barrier structure and functions that contribute to homeostasis. *Sci Rep*, 8(1): 14184.
- HEIN, R., KÖSTER, I., BOLLSCHWEILER, E. & SCHUBERT, I. (2014). Prevalence of inflammatory bowel disease: estimates for 2010 and trends in Germany from a large insurance-based regional cohort. *Scand J Gastroenterol*, 49(11): 1325-1335.
- HEMMI, H., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., KAISHO, T., SATO, S., SANJO, H., MATSUMOTO, M., HOSHINO, K., WAGNER, H., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813): 740-745.
- HORNEF, M. W., FRISAN, T., VANDEWALLE, A., NORMARK, S. & RICHTER-DAHLFORS, A. (2002). Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med*, 195(5): 559-570.
- HORNEF, M. W., NORMARK, B. H., VANDEWALLE, A. & NORMARK, S. (2003). Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J Exp Med*, 198(8): 1225-1235.
- HOVHANNISYAN, Z., TREATMAN, J., LITTMAN, D. R. & MAYER, L. (2011). Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140(3): 957-965.
- HSIAO, E. Y., MCBRIDE, S. W., HSIEN, S., SHARON, G., HYDE, E. R., MCCUE, T., CODELLI, J. A., CHOW, J., REISMAN, S. E., PETROSINO, J. F., PATTERSON, P. H. & MAZMANIAN, S. K. (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, 155(7): 1451-1463.

- HUEBER, W., SANDS, B. E., LEWITZKY, S., VANDEMEULEBROECKE, M., REINISCH, W., HIGGINS, P. D., WEHKAMP, J., FEAGAN, B. G., YAO, M. D., KARCZEWSKI, M., KARCZEWSKI, J., PEZOUS, N., BEK, S., BRUIN, G., MELLGARD, B., BERGER, C., LONDEI, M., BERTOLINO, A. P., TOUGAS, G. & TRAVIS, S. P. (2012). Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut*, 61(12): 1693-1700.
- ITO, R., KITA, M., SHIN-YA, M., KISHIDA, T., URANO, A., TAKADA, R., SAKAGAMI, J., IMANISHI, J., IWAKURA, Y., OKANOUE, T., YOSHIKAWA, T., KATAOKA, K. & MAZDA, O. (2008). Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 377(1): 12-16.
- IVANOV, II, ATARASHI, K., MANEL, N., BRODIE, E. L., SHIMA, T., KARAOZ, U., WEI, D., GOLDFARB, K. C., SANTEE, C. A., LYNCH, S. V., TANOUE, T., IMAOKA, A., ITOH, K., TAKEDA, K., UMESAKI, Y., HONDA, K. & LITTMAN, D. R. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 139(3): 485-498.
- IWASAKI, H., TAKEUCHI, O., TERAGUCHI, S., MATSUSHITA, K., UEHATA, T., KUNIYOSHI, K., SATOH, T., SAITOH, T., MATSUSHITA, M., STANDLEY, D. M. & AKIRA, S. (2011). The I $\kappa$ B kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR-IL-1R by controlling degradation of regnase-1. *Nat Immunol*, 12(12): 1167-1175.
- JELTSCH, K. M., HU, D., BRENNER, S., ZOLLER, J., HEINZ, G. A., NAGEL, D., VOGEL, K. U., REHAGE, N., WARTH, S. C., EDELMANN, S. L., GLOURY, R., MARTIN, N., LOHS, C., LECH, M., STEHKLEIN, J. E., GEERLOF, A., KREMMER, E., WEBER, A., ANDERS, H. J., SCHMITZ, I., SCHMIDT-SUPPRIAN, M., FU, M., HOLTSMANN, H., KRAPPMANN, D., RULAND, J., KALLIES, A., HEIKENWALDER, M. & HEISSMEYER, V. (2014). Cleavage of roquin and regnase-1 by the paracaspase MALT1 releases their cooperatively repressed targets to promote T(H)17 differentiation. *Nat Immunol*, 15(11): 1079-1089.
- JIANG, H., LING, Z., ZHANG, Y., MAO, H., MA, Z., YIN, Y., WANG, W., TANG, W., TAN, Z., SHI, J., LI, L. & RUAN, B. (2015). Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun*, 48: 186-194.
- JOSEFOWICZ, S. Z., NIEC, R. E., KIM, H. Y., TREUTING, P., CHINEN, T., ZHENG, Y., UMETSU, D. T. & RUDENSKY, A. Y. (2012). Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature*, 482(7385): 395-399.
- JURA, J., WEGRZYN, P., KOROSTYŃSKI, M., GUZIK, K., OCZKO-WOJCIECHOWSKA, M., JARZAB, M., KOWALSKA, M., PIECHOTA, M., PRZEWŁOCKI, R. & KOJ, A. (2008). Identification of interleukin-1 and interleukin-6-responsive genes in human monocyte-derived macrophages using microarrays. *Biochim Biophys Acta*, 1779(6-7): 383-389.

- KAKIUCHI, N., YOSHIDA, K., UCHINO, M., KIHARA, T., AKAKI, K., INOUE, Y., KAWADA, K., NAGAYAMA, S., YOKOYAMA, A., YAMAMOTO, S., MATSUURA, M., HORIMATSU, T., HIRANO, T., GOTO, N., TAKEUCHI, Y., OCHI, Y., SHIOZAWA, Y., KOGURE, Y., WATATANI, Y., FUJII, Y., KIM, S. K., KON, A., KATAOKA, K., YOSHIZATO, T., NAKAGAWA, M. M., YODA, A., NANYA, Y., MAKISHIMA, H., SHIRAISHI, Y., CHIBA, K., TANAKA, H., SANADA, M., SUGIHARA, E., SATO, T. A., MARUYAMA, T., MIYOSHI, H., TAKETO, M. M., OISHI, J., INAGAKI, R., UEDA, Y., OKAMOTO, S., OKAJIMA, H., SAKAI, Y., SAKURAI, T., HAGA, H., HIROTA, S., IKEUCHI, H., NAKASE, H., MARUSAWA, H., CHIBA, T., TAKEUCHI, O., MIYANO, S., SENO, H. & OGAWA, S. (2020). Frequent mutations that converge on the NFKBIZ pathway in ulcerative colitis. *Nature*, 577(7789): 260-265.
- KAMALI, A. N., NOORBAKHS, S. M., HAMEDIFAR, H., JADIDI-NIARAGH, F., YAZDANI, R., BAUTISTA, J. M. & AZIZI, G. (2019). A role for Th1-like Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune disorders. *Mol Immunol*, 105: 107-115.
- KANG, D. W., ADAMS, J. B., GREGORY, A. C., BORODY, T., CHITTICK, L., FASANO, A., KHORUTS, A., GEIS, E., MALDONADO, J., MCDONOUGH-MEANS, S., POLLARD, E. L., ROUX, S., SADOWSKY, M. J., LIPSON, K. S., SULLIVAN, M. B., CAPORASO, J. G. & KRAJMALNIK-BROWN, R. (2017). Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome*, 5(1): 10.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11(5): 373-384.
- KITAMURA, H., KANEHIRA, K., OKITA, K., MORIMATSU, M. & SAITO, M. (2000). MAIL, a novel nuclear I kappa B protein that potentiates LPS-induced IL-6 production. *FEBS Lett*, 485(1): 53-56.
- KLEINSCHKE, M. A., BONIFACE, K., SADEKOVA, S., GREIN, J., MURPHY, E. E., TURNER, S. P., RASKIN, L., DESAI, B., FAUBION, W. A., DE WAAL MALEFYT, R., PIERCE, R. H., MCCLANAHAN, T. & KASTELEIN, R. A. (2009). Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med*, 206(3): 525-534.
- KNOWLES, S. R., GRAFF, L. A., WILDING, H., HEWITT, C., KEEFER, L. & MIKOCKA-WALUS, A. (2018a). Quality of Life in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analyses-Part I. *Inflamm Bowel Dis*, 24(4): 742-751.
- KNOWLES, S. R., KEEFER, L., WILDING, H., HEWITT, C., GRAFF, L. A. & MIKOCKA-WALUS, A. (2018b). Quality of Life in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analyses-Part II. *Inflamm Bowel Dis*, 24(5): 966-976.
- LARSEN, N., VOGENSEN, F. K., VAN DEN BERG, F. W., NIELSEN, D. S., ANDREASEN, A. S., PEDERSEN, B. K., AL-SOUD, W. A., SØRENSEN, S. J., HANSEN, L. H. & JAKOBSEN, M. (2010). Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One*, 5(2): e9085.

- LEE, Y. K. & MAZMANIAN, S. K. (2010). Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science*, 330(6012): 1768-1773.
- LEPAGE, P., HÄSLER, R., SPEHLMANN, M. E., REHMAN, A., ZVIRBLIENE, A., BEGUN, A., OTT, S., KUPCINSKAS, L., DORÉ, J., RAEDLER, A. & SCHREIBER, S. (2011). Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 141(1): 227-236.
- 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. & BENICHO, J. (2007). Stressful life events as a risk factor for inflammatory bowel disease onset: A population-based case-control study. *Am J Gastroenterol*, 102(1): 122-131.
- LIANG, J., SAAD, Y., LEI, T., WANG, J., QI, D., YANG, Q., KOLATTUKUDY, P. E. & FU, M. (2010). MCP-induced protein 1 deubiquitinates TRAF proteins and negatively regulates JNK and NF-kappaB signaling. *J Exp Med*, 207(13): 2959-2973.
- LIANG, J., WANG, J., AZFER, A., SONG, W., TROMP, G., KOLATTUKUDY, P. E. & FU, M. (2008). A novel CCCH-zinc finger protein family regulates proinflammatory activation of macrophages. *J Biol Chem*, 283(10): 6337-6346.
- LIU, J. Z., VAN SOMMEREN, S., HUANG, H., NG, S. C., ALBERTS, R., TAKAHASHI, A., RIPKE, S., LEE, J. C., JOSTINS, L., SHAH, T., ABEDIAN, S., CHEON, J. H., CHO, J., DAYANI, N. E., FRANKE, L., FUYUNO, Y., HART, A., JUYAL, R. C., JUYAL, G., KIM, W. H., MORRIS, A. P., POUSTCHI, H., NEWMAN, W. G., MIDHA, V., ORCHARD, T. R., VAHEDI, H., SOOD, A., SUNG, J. Y., MALEKZADEH, R., WESTRA, H. J., YAMAZAKI, K., YANG, S. K., BARRETT, J. C., ALIZADEH, B. Z., PARKES, M., BK, T., DALY, M. J., KUBO, M., ANDERSON, C. A. & WEERSMA, R. K. (2015). Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet*, 47(9): 979-986.
- LIU, Z. J., YADAV, P. K., SU, J. L., WANG, J. S. & FEI, K. (2009). Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 15(46): 5784-5788.
- MAERZ, J. K., STEIMLE, A., LANGE, A., BENDER, A., FEHRENBACHER, B. & FRICK, J. S. (2018). Outer membrane vesicles blebbing contributes to *B. vulgatus* mpk-mediated immune response silencing. *Gut Microbes*, 9(1): 1-12.
- MAERZ, J. K., TROSTEL, C., LANGE, A., PARUSEL, R., MICHAELIS, L., SCHÄFER, A., YAO, H., LÖW, H. C. & FRICK, J. S. (2019). Bacterial Immunogenicity Is Critical for the Induction of Regulatory B Cells in Suppressing Inflammatory Immune Responses. *Front Immunol*, 10: 3093.
- MAHID, S. S., MINOR, K. S., SOTO, R. E., HORNUNG, C. A. & GALANDIUK, S. (2006). Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc*, 81(11): 1462-1471.

- MAILER, R. K. W., JOLY, A.-L., LIU, S., ELIAS, S., TEGNER, J. & ANDERSSON, J. (2015). IL-1 $\beta$  promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of FOXP3. *Scientific Reports*, 5(1): 14674.
- MATSUNO, H., KAYAMA, H., NISHIMURA, J., SEKIDO, Y., OSAWA, H., BARMAN, S., OGINO, T., TAKAHASHI, H., HARAGUCHI, N., HATA, T., MATSUDA, C., YAMAMOTO, H., UCHINO, M., IKEUCHI, H., DOKI, Y., MORI, M., TAKEDA, K. & MIZUSHIMA, T. (2017). CD103+ Dendritic Cell Function Is Altered in the Colons of Patients with Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 23(9): 1524-1534.
- MATSUOKA, K., INOUE, N., SATO, T., OKAMOTO, S., HISAMATSU, T., KISHI, Y., SAKURABA, A., HITOTSUMATSU, O., OGATA, H., KOGANEI, K., FUKUSHIMA, T., KANAI, T., WATANABE, M., ISHII, H. & HIBI, T. (2004). T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease. *Gut*, 53(9): 1303-1308.
- MATSUSHITA, K., TAKEUCHI, O., STANDLEY, D. M., KUMAGAI, Y., KAWAGOE, T., MIYAKE, T., SATOH, T., KATO, H., TSUJIMURA, T., NAKAMURA, H. & AKIRA, S. (2009). Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature*, 458(7242): 1185-1190.
- MCGEACHY, M. J., CUA, D. J. & GAFFEN, S. L. (2019). The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity*, 50(4): 892-906.
- MICHAELIS, L., TREß, M., LÖW, H. C., KLEES, J., KLAMETH, C., LANGE, A., GRIßHAMMER, A., SCHÄFER, A., MENZ, S., STEIMLE, A., SCHULZE-OSTHOFF, K. & FRICK, J. S. (2021). Gut Commensal-Induced I $\kappa$ B $\zeta$  Expression in Dendritic Cells Influences the Th17 Response. *Front Immunol*, 11: 612336.
- MICHELSEN, K. S., AICHER, A., MOHAUPT, M., HARTUNG, T., DIMMELER, S., KIRSCHNING, C. J. & SCHUMANN, R. R. (2001). The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *J Biol Chem*, 276(28): 25680-25686.
- MIDDEL, P., RADDATZ, D., GUNAWAN, B., HALLER, F. & RADZUN, H. J. (2006). Increased number of mature dendritic cells in Crohn's disease: evidence for a chemokine mediated retention mechanism. *Gut*, 55(2): 220-227.
- MINO, T., MURAKAWA, Y., FUKAO, A., VANDENBON, A., WESSELS, H. H., ORI, D., UEHATA, T., TARTEY, S., AKIRA, S., SUZUKI, Y., VINUESA, C. G., OHLER, U., STANDLEY, D. M., LANDTHALER, M., FUJIWARA, T. & TAKEUCHI, O. (2015). Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct Mechanisms. *Cell*, 161(5): 1058-1073.
- MONIN, L., GUDJONSSON, J. E., CHILDS, E. E., AMATYA, N., XING, X., VERMA, A. H., COLEMAN, B. M., GARG, A. V., KILLEEN, M., MATHERS, A., WARD, N. L. & GAFFEN, S. L. (2017). MCP1/Regnase-1 Restricts IL-17A- and IL-17C-Dependent Skin Inflammation. *J Immunol*, 198(2): 767-775.

- MOTOYAMA, M., YAMAZAKI, S., ETO-KIMURA, A., TAKESHIGE, K. & MUTA, T. (2005). Positive and negative regulation of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by I kappa B-zeta, an inducible nuclear protein. *J Biol Chem*, 280(9): 7444-7451.
- MÜLLER, M., FINK, K., GEISEL, J., KAHL, F., JILGE, B., REIMANN, J., MACH, N., AUTENRIETH, I. B. & FRICK, J. S. (2008). Intestinal colonization of IL-2 deficient mice with non-colitogenic *B. vulgatus* prevents DC maturation and T-cell polarization. *PLoS One*, 3(6): e2376.
- MUROMOTO, R., TAWA, K., OHGAKIUCHI, Y., SATO, A., SAINO, Y., HIRASHIMA, K., MINOGUCHI, H., KITAI, Y., KASHIWAKURA, J. I., SHIMODA, K., ORITANI, K. & MATSUDA, T. (2019). I kappa B-ζ Expression Requires Both TYK2/STAT3 Activity and IL-17-Regulated mRNA Stabilization. *Immunohorizons*, 3(5): 172-185.
- MURRI, M., LEIVA, I., GOMEZ-ZUMAQUERO, J. M., TINAHONES, F. J., CARDONA, F., SORIGUER, F. & QUEIPO-ORTUÑO, M. I. (2013). Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Med*, 11: 46.
- NAGAHAMA, Y., SHIMODA, M., MAO, G., SINGH, S. K., KOZAKAI, Y., SUN, X., MOTOOKA, D., NAKAMURA, S., TANAKA, H., SATOH, T., MAEDA, K. & AKIRA, S. (2018). Regnase-1 controls colon epithelial regeneration via regulation of mTOR and purine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(43): 11036-11041.
- NANKI, K., FUJII, M., SHIMOKAWA, M., MATANO, M., NISHIKORI, S., DATE, S., TAKANO, A., TOSHIMITSU, K., OHTA, Y., TAKAHASHI, S., SUGIMOTO, S., ISHIMARU, K., KAWASAKI, K., NAGAI, Y., ISHII, R., YOSHIDA, K., SASAKI, N., HIBI, T., ISHIHARA, S., KANAI, T. & SATO, T. (2020). Somatic inflammatory gene mutations in human ulcerative colitis epithelium. *Nature*, 577(7789): 254-259.
- NEURATH, M. F., WEIGMANN, B., FINOTTO, S., GLICKMAN, J., NIEUWENHUIS, E., IJIMA, H., MIZOGUCHI, A., MIZOGUCHI, E., MUDTER, J., GALLE, P. R., BHAN, A., AUTSCHBACH, F., SULLIVAN, B. M., SZABO, S. J., GLIMCHER, L. H. & BLUMBERG, R. S. (2002). The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med*, 195(9): 1129-1143.
- NG, S. C., SHI, H. Y., HAMIDI, N., UNDERWOOD, F. E., TANG, W., BENCHIMOL, E. I., PANACCIONE, R., GHOSH, S., WU, J. C. Y., CHAN, F. K. L., SUNG, J. J. Y. & KAPLAN, G. G. (2018). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*, 390(10114): 2769-2778.
- NI, J., WU, G. D., ALBENBERG, L. & TOMOV, V. T. (2017). Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 14(10): 573-584.
- NYIRENDA, M. H., SANVITO, L., DARLINGTON, P. J., O'BRIEN, K., ZHANG, G. X., CONSTANTINESCU, C. S., BAR-OR, A. & GRAN, B. (2011). TLR2 stimulation drives human naive and effector regulatory T cells into a Th17-like phenotype with reduced suppressive function. *J Immunol*, 187(5): 2278-2290.

- OHNMACHT, C., PULLNER, A., KING, S. B., DREXLER, I., MEIER, S., BROCKER, T. & VOEHRINGER, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med*, 206(3): 549-559.
- OHNO, Y., KITAMURA, H., TAKAHASHI, N., OHTAKE, J., KANEUMI, S., SUMIDA, K., HOMMA, S., KAWAMURA, H., MINAGAWA, N., SHIBASAKI, S. & TAKETOMI, A. (2016). IL-6 down-regulates HLA class II expression and IL-12 production of human dendritic cells to impair activation of antigen-specific CD4(+) T cells. *Cancer Immunol Immunother*, 65(2): 193-204.
- OKADA, S., PUEL, A., CASANOVA, J. L. & KOBAYASHI, M. (2016). Chronic mucocutaneous candidiasis disease associated with inborn errors of IL-17 immunity. *Clin Transl Immunology*, 5(12): e114.
- OKAMOTO, K., IWAI, Y., OH-HORA, M., YAMAMOTO, M., MORIO, T., AOKI, K., OHYA, K., JETTEN, A. M., AKIRA, S., MUTA, T. & TAKAYANAGI, H. (2010). I $\kappa$ B $\zeta$  regulates T(H)17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature*, 464(7293): 1381-1385.
- OLÉN, O., ERICHSEN, R., SACHS, M. C., PEDERSEN, L., HALFVARSON, J., ASKLING, J., EKBOM, A., SØRENSEN, H. T. & LUDVIGSSON, J. F. (2020). Colorectal cancer in ulcerative colitis: a Scandinavian population-based cohort study. *Lancet*, 395(10218): 123-131.
- OLSEN, I. & SOLLID, L. M. (2013). Pitfalls in determining the cytokine profile of human T cells. *J Immunol Methods*, 390(1-2): 106-112.
- OWAGA, E., HSIEH, R. H., MUGENDI, B., MASUKU, S., SHIH, C. K. & CHANG, J. S. (2015). Th17 Cells as Potential Probiotic Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Diseases. *Int J Mol Sci*, 16(9): 20841-20858.
- PARAMSOTHY, S., KAMM, M. A., KAAKOUSH, N. O., WALSH, A. J., VAN DEN BOGAERDE, J., SAMUEL, D., LEONG, R. W. L., CONNOR, S., NG, W., PARAMSOTHY, R., XUAN, W., LIN, E., MITCHELL, H. M. & BORODY, T. J. (2017). Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 389(10075): 1218-1228.
- PARK, J. S., CHOI, J. W., JHUN, J., KWON, J. Y., LEE, B. I., YANG, C. W., PARK, S. H. & CHO, M. L. (2018). Lactobacillus acidophilus Improves Intestinal Inflammation in an Acute Colitis Mouse Model by Regulation of Th17 and Treg Cell Balance and Fibrosis Development. *J Med Food*, 21(3): 215-224.
- PARK, S.-J., NAKAGAWA, T., KITAMURA, H., ATSUMI, T., KAMON, H., SAWA, S.-I., KAMIMURA, D., UEDA, N., IWAKURA, Y., ISHIHARA, K., MURAKAMI, M. & HIRANO, T. (2004). IL-6 Regulates In Vivo Dendritic Cell Differentiation through STAT3 Activation. *The Journal of Immunology*, 173(6): 3844-3854.
- PEARCE, S. C., COIA, H. G., KARL, J. P., PANTOJA-FELICIANO, I. G., ZACHOS, N. C. & RACICOT, K. (2018). Intestinal in vitro and ex vivo Models to Study Host-Microbiome Interactions and Acute Stressors. *Front Physiol*, 9: 1584.
- PERSSON, P. G., AHLBOM, A. & HELLERS, G. (1992). Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology*, 3(1): 47-52.

- PICKARD, J. M., ZENG, M. Y., CARUSO, R. & NÚÑEZ, G. (2017). Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev*, 279(1): 70-89.
- PRENZLER, A., BOKEMEYER, B., VON DER SCHULENBURG, J. M. & MITTENDORF, T. (2011). Health care costs and their predictors of inflammatory bowel diseases in Germany. *Eur J Health Econ*, 12(3): 273-283.
- QI, D., HUANG, S., MIAO, R., SHE, Z. G., QUINN, T., CHANG, Y., LIU, J., FAN, D., CHEN, Y. E. & FU, M. (2011). Monocyte chemotactic protein-induced protein 1 (MCP1) suppresses stress granule formation and determines apoptosis under stress. *J Biol Chem*, 286(48): 41692-41700.
- QIN, J., LI, R., RAES, J., ARUMUGAM, M., BURGDORF, K. S., MANICHANH, C., NIELSEN, T., PONS, N., LEVENEZ, F., YAMADA, T., MENDE, D. R., LI, J., XU, J., LI, S., LI, D., CAO, J., WANG, B., LIANG, H., ZHENG, H., XIE, Y., TAP, J., LEPAGE, P., BERTALAN, M., BATTO, J. M., HANSEN, T., LE PASLIER, D., LINNEBERG, A., NIELSEN, H. B., PELLETIER, E., RENAULT, P., SICHERITZ-PONTEN, T., TURNER, K., ZHU, H., YU, C., LI, S., JIAN, M., ZHOU, Y., LI, Y., ZHANG, X., LI, S., QIN, N., YANG, H., WANG, J., BRUNAK, S., DORÉ, J., GUARNER, F., KRISTIANSEN, K., PEDERSEN, O., PARKHILL, J., WEISSENBACH, J., BORK, P., EHRLICH, S. D. & WANG, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285): 59-65.
- 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(2): 229-241.
- RIDAURA, V. K., FAITH, J. J., REY, F. E., CHENG, J., DUNCAN, A. E., KAU, A. L., GRIFFIN, N. W., LOMBARD, V., HENRISSAT, B., BAIN, J. R., MUEHLBAUER, M. J., ILKAYEVA, O., SEMENKOVICH, C. F., FUNAI, K., HAYASHI, D. K., LYLE, B. J., MARTINI, M. C., URSELL, L. K., CLEMENTE, J. C., VAN TREUREN, W., WALTERS, W. A., KNIGHT, R., NEWGARD, C. B., HEATH, A. C. & GORDON, J. I. (2013). Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*, 341(6150): 1241214.
- ROCHMAN, I., PAUL, W. E. & BEN-SASSON, S. Z. (2005). IL-6 increases primed cell expansion and survival. *J Immunol*, 174(8): 4761-4767.
- ROUND, J. L., LEE, S. M., LI, J., TRAN, G., JABRI, B., CHATILA, T. A. & MAZMANIAN, S. K. (2011). The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science*, 332(6032): 974-977.
- ROUND, J. L. & MAZMANIAN, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*, 9(5): 313-323.
- ROUND, J. L. & MAZMANIAN, S. K. (2010). Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(27): 12204-12209.

- SCHWANDNER, R., DZIARSKI, R., WESCHE, H., ROTHE, M. & KIRSCHNING, C. J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*, 274(25): 17406-17409.
- SENDER, R., FUCHS, S. & MILO, R. (2016). Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*, 164(3): 337-340.
- SESHADRI, S., KANNAN, Y., MITRA, S., PARKER-BARNES, J. & WEWERS, M. D. (2009). MAIL regulates human monocyte IL-6 production. *J Immunol*, 183(8): 5358-5368.
- SHAN, M., GENTILE, M., YEISER, J. R., WALLAND, A. C., BORNSTEIN, V. U., CHEN, K., HE, B., CASSIS, L., BIGAS, A., COLS, M., COMERMA, L., HUANG, B., BLANDER, J. M., XIONG, H., MAYER, L., BERIN, C., AUGENLICHT, L. H., VELCICH, A. & CERUTTI, A. (2013). Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science*, 342(6157): 447-453.
- SHIINA, T., KONNO, A., OONUMA, T., KITAMURA, H., IMAOKA, K., TAKEDA, N., TODOKORO, K. & MORIMATSU, M. (2004). Targeted disruption of MAIL, a nuclear I $\kappa$ B protein, leads to severe atopic dermatitis-like disease. *J Biol Chem*, 279(53): 55493-55498.
- SHIN, H. S., XU, F., BAGCHI, A., HERRUP, E., PRAKASH, A., VALENTINE, C., KULKARNI, H., WILHELMSSEN, K., WARREN, S. & HELLMAN, J. (2011). Bacterial lipoprotein TLR2 agonists broadly modulate endothelial function and coagulation pathways in vitro and in vivo. *J Immunol*, 186(2): 1119-1130.
- SLOWIKOWSKI, K., NGUYEN, H. N., NOSS, E. H., SIMMONS, D. P., MIZOGUCHI, F., WATTS, G. F. M., GURISH, M. F., BRENNER, M. B. & RAYCHAUDHURI, S. (2020). CUX1 and I $\kappa$ B $\zeta$  (NFKBIZ) mediate the synergistic inflammatory response to TNF and IL-17A in stromal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(10): 5532-5541.
- SPEHLMANN, M. E., BEGUN, A. Z., BURGHARDT, J., LEPAGE, P., RAEDLER, A. & SCHREIBER, S. (2008). Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis*, 14(7): 968-976.
- STEIMLE, A. & FRICK, J. S. (2016). Molecular Mechanisms of Induction of Tolerant and Tolerogenic Intestinal Dendritic Cells in Mice. *J Immunol Res*, 2016: 1958650.
- STEIMLE, A., MICHAELIS, L., DI LORENZO, F., KLIEM, T., MÜNZNER, T., MAERZ, J. K., SCHÄFER, A., LANGE, A., PARUSEL, R., GRONBACH, K., FUCHS, K., SILIPO, A., ÖZ, H. H., PICHLER, B. J., AUTENRIETH, I. B., MOLINARO, A. & FRICK, J. S. (2019). Weak Agonistic LPS Restores Intestinal Immune Homeostasis. *Mol Ther*, 27(11): 1974-1991.
- STOCKINGER, B. & OMENETTI, S. (2017). The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat Rev Immunol*, 17(9): 535-544.
- TORRES, J., MEHANDRU, S., COLOMBEL, J. F. & PEYRIN-BIROULET, L. (2017). Crohn's disease. *Lancet*, 389(10080): 1741-1755.

- TURNBAUGH, P. J., HAMADY, M., YATSUNENKO, T., CANTAREL, B. L., DUNCAN, A., LEY, R. E., SOGIN, M. L., JONES, W. J., ROE, B. A., AFFOURTIT, J. P., EGHOLM, M., HENRISSAT, B., HEATH, A. C., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228): 480-484.
- TURNBAUGH, P. J., LEY, R. E., HAMADY, M., FRASER-LIGGETT, C. M., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, 449(7164): 804-810.
- UEHATA, T., IWASAKI, H., VANDENBON, A., MATSUSHITA, K., HERNANDEZ-CUELLAR, E., KUNIYOSHI, K., SATOH, T., MINO, T., SUZUKI, Y., STANDLEY, D. M., TSUJIMURA, T., RAKUGI, H., ISAKA, Y., TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. (2013). Malt1-induced cleavage of regnase-1 in CD4(+) helper T cells regulates immune activation. *Cell*, 153(5): 1036-1049.
- UENO, A., JIJON, H., CHAN, R., FORD, K., HIROTA, C., KAPLAN, G. G., BECK, P. L., IACUCCI, M., FORT GASIA, M., BARKEMA, H. W., PANACCIONE, R. & GHOSH, S. (2013). Increased prevalence of circulating novel IL-17 secreting Foxp3 expressing CD4+ T cells and defective suppressive function of circulating Foxp3+ regulatory cells support plasticity between Th17 and regulatory T cells in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis*, 19(12): 2522-2534.
- UNGARO, R., MEHANDRU, S., ALLEN, P. B., PEYRIN-BIROULET, L. & COLOMBEL, J. F. (2017). Ulcerative colitis. *Lancet*, 389(10080): 1756-1770.
- VAN AUBEL, R. A., KEESTRA, A. M., KROOSHOOP, D. J., VAN EDEN, W. & VAN PUTTEN, J. P. (2007). Ligand-induced differential cross-regulation of Toll-like receptors 2, 4 and 5 in intestinal epithelial cells. *Mol Immunol*, 44(15): 3702-3714.
- VAN NOOD, E., VRIEZE, A., NIEUWDORP, M., FUENTES, S., ZOETENDAL, E. G., DE VOS, W. M., VISSER, C. E., KUIJPER, E. J., BARTELSMAN, J. F., TIJSEN, J. G., SPEELMAN, P., DIJKGRAAF, M. G. & KELLER, J. J. (2013). Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*, 368(5): 407-415.
- VENY, M., ESTELLER, M., RICART, E., PIQUÉ, J. M., PANÉS, J. & SALAS, A. (2010). Late Crohn's disease patients present an increase in peripheral Th17 cells and cytokine production compared with early patients. *Aliment Pharmacol Ther*, 31(5): 561-572.
- VOIGTLÄNDER, C., RÖNER, S., CIERPKA, E., THEINER, G., WIETHE, C., MENGES, M., SCHULER, G. & LUTZ, M. B. (2006). Dendritic Cells Matured With TNF can be Further Activated In Vitro and After Subcutaneous Injection In Vivo Which Converts Their Tolerogenicity Into Immunogenicity. *Journal of Immunotherapy*, 29(4): 407-415.
- VOO, K. S., WANG, Y. H., SANTORI, F. R., BOGGIANO, C., WANG, Y. H., ARIMA, K., BOVER, L., HANABUCHI, S., KHALILI, J., MARINOVA, E., ZHENG, B., LITTMAN, D. R. & LIU, Y. J. (2009). Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(12): 4793-4798.

- 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(1): 162-177.
- WANG, S. L., WANG, Z. R. & YANG, C. Q. (2012). Meta-analysis of broad-spectrum antibiotic therapy in patients with active inflammatory bowel disease. *Exp Ther Med*, 4(6): 1051-1056.
- YAMAMOTO, M., YAMAZAKI, S., UEMATSU, S., SATO, S., HEMMI, H., HOSHINO, K., KAISHO, T., KUWATA, H., TAKEUCHI, O., TAKESHIGE, K., SAITOH, T., YAMAOKA, S., YAMAMOTO, N., YAMAMOTO, S., MUTA, T., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2004). Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I $\kappa$ B $\zeta$ . *Nature*, 430(6996): 218-222.
- YAMAZAKI, S., MUTA, T., MATSUO, S. & TAKESHIGE, K. (2005). Stimulus-specific induction of a novel nuclear factor- $\kappa$ B regulator, I $\kappa$ B $\zeta$ , via Toll/Interleukin-1 receptor is mediated by mRNA stabilization. *J Biol Chem*, 280(2): 1678-1687.
- YAMAZAKI, S., MUTA, T. & TAKESHIGE, K. (2001). A novel I $\kappa$ B protein, I $\kappa$ B $\zeta$ , induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor- $\kappa$ B in the nuclei. *J Biol Chem*, 276(29): 27657-27662.
- YE, M., JOOSSE, M. E., LIU, L., SUN, Y., DONG, Y., CAI, C., SONG, Z., ZHANG, J., BRANT, S. R., LAZAREV, M. & LI, X. (2019). Deletion of IL-6 exacerbates colitis and induces systemic inflammation in IL-10-deficient mice. *J Crohns Colitis*.
- ZHANG, Q., LENARDO, M. J. & BALTIMORE, D. (2017). 30 Years of NF- $\kappa$ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell*, 168(1-2): 37-57.
- ZHU, J. (2018). T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(10).
- ZHU, J. & PAUL, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5): 1557-1569.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

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

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Julia-Stefanie Frick und Lena Michaelis.

Die Stimulationsversuche und die anschließende FACS-Analyse wurden von mir in Zusammenarbeit mit Lena Michaelis durchgeführt. Die Präparation der Versuchstiere und die Kultivierung der Zellen wurde teilweise von Anne Gießhammer, Dr. Anna Lange, Dr. Jan Maerz, Raphael Parusel, Tinotenda Pesanai und Andrea Schäfer unterstützt. Die qPCR- und ELISA-Analysen wurden nach Einarbeitung durch Lena Michaelis von mir durchgeführt.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte nach Anleitung durch Lena Michaelis durch mich.

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

Tübingen, 20. April 2021

.....

Marcel Treß

## 8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

MICHAELIS, L., TREß, M., LÖW, H. C., KLEES, J., KLAMETH, C., LANGE, A., GRIEßHAMMER, A., SCHÄFER, A., MENZ, S., STEIMLE, A., SCHULZE-OSTHOFF, K. & FRICK, J. S. (2021). Gut Commensal-Induced IκBζ Expression in Dendritic Cells Influences the Th17 Response. *Front Immunol*, 11: 612336.

## Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Julia-Stefanie Frick für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe zu diesem interessanten Thema anfertigen zu können, danken. Ich bedanke mich insbesondere für die hervorragende Betreuung, die guten Ratschläge und die außerordentlich angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt Lena Michaelis, die mich während meiner Zeit im Labor und darüber hinaus immer exzellent betreut und unterstützt hat, von der ich viel lernen durfte und ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank für die schöne Zusammenarbeit, die Geduld beim Beantworten meiner Fragen, die Hilfe im Labor und bei der Korrektur der Arbeit.

Auch bei allen anderen Mitgliedern der AG Frick möchte ich mich herzlich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Hilfe und Unterstützung im Labor und die schöne Zeit im Institut bedanken.

Dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen eines Promotionsstipendiums.

Schließlich möchte ich ganz besonders meiner Familie danken, die mir mein Studium erst ermöglicht hat und mich immer unterstützt. Danke für alles!