

Aus der  
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

(Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie, Klinische  
Immunologie, Rheumatologie)

**Einfluss des Formylpeptidrezeptors 2 auf die Homöostase  
Dendritischer Zellen**

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

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

**vorgelegt von**

**Heyne, Ulf**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatterin: Professorin Dr. S.E. Autenrieth  
2. Berichterstatterin: Professorin Dr. R. Klein

Tag der Disputation: 09.11.2022

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	
Abkürzungsverzeichnis .....	
1 Einleitung .....	1
1.1 Dendritische Zellen.....	1
1.1.1 Abstammung und Vorläufer der Dendritischen Zellen .....	2
1.1.2 Subpopulationen der Dendritischen Zellen .....	3
1.1.3 Homöostase und Lebenszyklen von Dendritischen Zellen .....	10
1.1.4 Schlüsselfunktionen von Dendritischen Zellen .....	14
1.2 Arten des Zelltodes und ihre Bedeutung für Homöostase und Funktion Dendritischer Zellen.....	19
1.3 Der Formylpeptidrezeptor 2.....	24
1.4 Ziel der Dissertation .....	26
2 Material und Methoden.....	27
2.1 Wildtyp- und FPR2 <sup>(-/-)</sup> -Mäuse .....	27
2.2 Organentnahme und -aufbereitung .....	27
2.2.1 Entnahme der Organe .....	27
2.2.2 Aufbereitung der Milz.....	28
2.2.3 Aufreinigung des Knochenmarks .....	29
2.3 Zellkulturen aus Knochenmarkszellen.....	30
2.3.1 Ansetzen von Zellkulturen mit GM-CSF.....	30
2.3.2 Ernten der BMDCs.....	30
2.3.3 Aussäen und Stimulation der BMDCs mit LPS .....	31
2.4 Färbung der Zellen für die Analyse im Durchflusszytometer .....	33
2.4.1 Fluorescence Minus One-Kontrollen.....	33
2.4.2 Kompensationskontrollen .....	33
2.4.3 Extrazelluläre Färbung der Vorläuferzellen im Knochenmark.....	33

2.4.4	Extrazelluläre Färbung der DCs aus der Milz .....	35
2.4.5	Apoptose-Assay mit Annexin V und 7AAD von Milz-DCs .....	36
2.4.6	Intrazelluläre Färbung von Bcl-2 .....	36
2.4.7	Extrazelluläre Färbung der mit LPS stimulierten BMDCs .....	38
2.5	ELISA der durch die BMDCs sezernierten Zytokine.....	39
2.5.1	TNF ELISA .....	39
2.5.2	IL-10 ELISA .....	41
2.5.3	IL-12 ELISA .....	43
2.6	Durchflusszytometer.....	45
2.7	Software zur Analyse der Rohdaten.....	46
2.8	Statistische Analyse .....	46
3	Ergebnisteil.....	46
3.1	Der FPR2 zeigt keinen Einfluss auf die Verteilung von DC-Vorläuferzellen im Knochenmark .....	46
3.2	C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäuse zeigen unterschiedliche Verteilungen von DC-Subpopulationen in der Milz .....	56
3.3	Der FPR2 beeinflusst das Überleben von Dendritischen Zellen und ihren Subpopulationen.....	64
3.4	Der FPR2 zeigt einen Einfluss auf die intrazelluläre Menge von Bcl-2	75
3.5	Der FPR2 hat keinen Einfluss auf den Reifeprozess von Dendritischen Zellen.....	81
3.6	Der FPR2 zeigt einen Einfluss auf die Sezernierung von IL-10.....	97
4	Diskussion.....	101
4.1	Diskussion der Methoden.....	102
4.1.1	Verwendung von BMDCs .....	102
4.1.2	Analyse von intrazellulären Bcl-2-Mengen.....	102
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	103

4.2.1	Der FPR2 hat keinen Einfluss auf prozentuale Verteilung und Zellzahlen von DC-Vorläufern im Knochenmark .....	103
4.2.2	Der FPR2 zeigt Einfluss auf die prozentuale Verteilung von DC-Populationen in der Milz .....	104
4.2.3	In der Milz zeigen ansässige FPR2 <sup>-/-</sup> -DCs ein besseres Überleben als C57BL/6-DCs .....	106
4.2.4	FPR2 <sup>-/-</sup> und C57BL/6-BMDCs gleichen sich in ihrer Maturation	107
4.2.5	Der FPR2 beeinflusst die Sekretion von IL-10 .....	108
4.3	Ausblick .....	109
5	Zusammenfassung .....	110
6	Referenzen .....	111
7	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift .....	133
8	Danksagung .....	134

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Gating-Strategie zur Unterscheidung der Zielzellen von membranösen Debris und anderen Zellen im Knochenmark ..	47
Abbildung 2:	Gating-Strategie zur Identifizierung von MDPs und CDPs .....	48
Abbildung 3:	Gating-Strategie zur Identifizierung von Monozyten, Monoblasten und Promonozyten .....	49
Abbildung 4:	Gating-Strategie zur Identifizierung von DCs und pre-DCs: (A) Lineage <sup>-</sup> Zellen .....	50
Abbildung 5:	Anzahl an lebenden Zellen im Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	50
Abbildung 6:	Relativer Anteil und absolute Anzahl an MDPs im Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	51
Abbildung 7:	Relativer Anteil und absolute Anzahl an CDPs im Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	52
Abbildung 8:	Relativer Anteil und absolute Anzahl an Monozyten im Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	53
Abbildung 9:	Relativer Anteil und absolute Anzahl an pre-DCs im Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	54

Abbildung 10:	Relativer Anteil und absolute Anzahl an DCs im Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	55
Abbildung 11:	Gating-Strategie zur Unterscheidung der Zielzellen von membranösen Debris und anderen milzständigen Zellen .....	57
Abbildung 12:	Gating-Strategie zur Identifizierung von DCs, DC-Subpopulationen und Monozyten.....	58
Abbildung 13:	Lebende Zellen in der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen. ....	59
Abbildung 14:	Relativer Anteil und absolute Anzahl an DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	60
Abbildung 15:	Relativer Anteil und absolute Anzahl an CD4 <sup>+</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	61
Abbildung 16:	Relativer Anteil und absolute Anzahl an CD8 <sup>+</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen. ....	62
Abbildung 17:	Relativer Anteil und absolute Anzahl an CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	63
Abbildung 18:	Gating-Strategie zur Unterscheidung der Zielzellen von membranösen Debris und anderen Zellen der Milz .....	65
Abbildung 19:	Gating-Strategie zur Identifizierung von DCs und DC-Subpopulationen sowie zur Ermittlung der Bindung von Annexin V und 7AAD .....	66
Abbildung 20:	Normalisierte Anteile an Annexin V <sup>-</sup> 7AAD <sup>-</sup> DCs und Annexin V <sup>+</sup> 7AAD <sup>-</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	67
Abbildung 21:	Normalisierte Anteile an Annexin V <sup>+</sup> 7AAD <sup>+</sup> DCs und Annexin V <sup>-</sup> 7AAD <sup>+</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	68
Abbildung 22:	Normalisierte Anteile an Annexin V <sup>-</sup> 7AAD <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> DCs und Annexin V <sup>+</sup> 7AAD <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	69
Abbildung 23:	Normalisierte Anteile an Annexin V <sup>+</sup> 7AAD <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> DCs und Annexin V <sup>-</sup> 7AAD <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	70
Abbildung 24:	Normalisierte Anteile an Annexin V <sup>-</sup> 7AAD <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> DCs und Annexin V <sup>+</sup> 7AAD <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	71
Abbildung 25:	Normalisierte Anteile an Annexin V <sup>+</sup> 7AAD <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> DCs und Annexin V <sup>-</sup> 7AAD <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	72

Abbildung 26:	Normalisierte Anteile an Annexin V <sup>-</sup> 7AAD <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> DCs und Annexin V <sup>+</sup> 7AAD <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	73
Abbildung 27:	Normalisierte Anteile an Annexin V <sup>+</sup> 7AAD <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> DCs und Annexin V <sup>-</sup> 7AAD <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	74
Abbildung 28:	Gating-Strategie zur Unterscheidung der Zielzellen von membranösen Debris und anderen Zellen der Milz .....	76
Abbildung 29:	Gating-Strategie zur Identifizierung von DCs und DC-Subpopulationen sowie zur Ermittlung des intrazellulären Medians von Bcl-2 .....	76
Abbildung 30:	Normalisierte Mediane von Bcl-2 in den DCs der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	77
Abbildung 31:	Normalisierte Mediane von Bcl-2 in den CD172a <sup>+</sup> DCs der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	78
Abbildung 32:	Normalisierte Mediane von Bcl-2 in den XCR1 <sup>+</sup> DCs der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	79
Abbildung 33:	Normalisierte Mediane von Bcl-2 in den dnDCs der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	80
Abbildung 34:	Normalisierte Mediane von Bcl-2 in den „nicht“-DCs der Milz von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	81
Abbildung 35:	Gating-Strategie zur Unterscheidung der Zielzellen von membranösen Debris und anderen Zellen bzw. nicht gereiften Zellen. (A) „Timegate“, (B) Einzelzellen, (C) Immunzellen, (D) lebende Zellen .....	82
Abbildung 36:	Gating-Strategie zur Unterscheidung der maturierten BMDCs von nicht gereiften und anderen Zellen.....	82
Abbildung 37:	Normalisierte Mediane von MHC II auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen ohne und nach 6 h Stimulation mit LPS .....	83
Abbildung 38:	Normalisierte Mediane von MHC II auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen ohne und nach 24 h Stimulation mit LPS .....	84
Abbildung 39:	Normalisierte Mediane von CD86 auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen ohne und nach 6 h Stimulation mit LPS. ....	86
Abbildung 40:	Normalisierte Mediane von CD86 auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen ohne und nach 24 h Stimulation mit LPS .....	87
Abbildung 41:	Normalisierte Mediane von CD80 auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen ohne und nach 6 h Stimulation mit LPS .....	88

Abbildung 42:	Normalisierte Mediane von CD80 auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen ohne und nach 24 h Stimulation mit LPS .....	90
Abbildung 43:	Normalisierte Mediane von CD54 auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen ohne und nach 6 h Stimulation mit LPS .....	91
Abbildung 44:	Normalisierte Mediane von CD54 auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen ohne und nach 24 h Stimulation mit LPS. ....	93
Abbildung 45:	Normalisierte Mediane von CD40 auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen ohne und nach 6 h Stimulation mit LPS .....	94
Abbildung 46:	Normalisierte Mediane von CD40 auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen ohne und nach 24 h Stimulation mit LPS .....	96
Abbildung 47:	Sezernierte Konzentration von TNF durch BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen ohne und nach 24 h Stimulation mit LPS .....	98
Abbildung 48:	Sezernierte Konzentration von IL-12 durch BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen ohne und nach 24 h Stimulation mit LPS. ....	99
Abbildung 49:	Sezernierte Konzentration von IL-10 durch BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2 <sup>-/-</sup> -Mäusen ohne und nach 24 h Stimulation mit LPS. ....	100

## Abkürzungsverzeichnis

AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor 1
APC	Antigen-presenting cell
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2-associated agonist of cell death
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
BATF3	Basic leucine zipper ATF-like transcription factor 3
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-w	B-cell-lymphoma-w
Bcl-x <sub>L</sub>	B-cell-lymphoma-extra-large
BID	BH3-interacting domain death agonist
Bik	Bcl-2-interacting killer
Bim	Bcl-2-like protein 11



BMDC	Bone marrow dendritic cell
Caspase	CysteinyI-aspartate specific protease
CCL21	C-C-chemokine ligand 21
CCR2	C-C-chemokine receptor type 2
CCR6	C-C-chemokine receptor type 6
CCR7	C-C-chemokine receptor type 7
CD	Cluster of differentiation
CD103	Integrin $\alpha E\beta 7$
CD11b	Integrin $\alpha$ -M
CD11c	Integrin $\alpha$ -X
CD207	Langerin
CD27	Rezeptor der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie
CD45	Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C
cDC	Conventional DC
CDP	Common dendritic cell precursors
c-Kit	Tyrosinkinase KIT (CD117)
CLP	Common lymphoid progenitors
CLR	C-type-lectin-receptors
CMP	Common myeloid progenitors
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CD28)
CX3CR1	CX3C chemokine receptor 1
DC	Dendritische Zelle
DR	Todesrezeptoren
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMP	Erythro-Myeloider Progenitor
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
ESAM	Endothelial cell specific adhesion molecule
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-assozierte Protein mit Todesdomäne
Fas-Rezeptoren	FS-7-associated surface antigen
Fc	Fragment crystallisable
FcgR	Fc Gamma Rezeptor
FCS	Fetales Kälberserum
Flt3	Fms-like tyrosine kinase (CD135)
Flt3L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
FMO	Flourescence Minus One
Foxp3	Forkhead-box-protein P3
FPR	Formylpeptidrezeptor
FPR2	Formylpeptidrezeptor 2
fpr-rs1	Formylpeptidrezeptor 1
FSC-A	Forward scatter-area
FSC-H	Forward scatter-height
GM-CSF	Granulozyte-macrophage-colony-stimulating-factor
HRP	Horseradish-Peroxidase
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54)
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-10	Interleukin 10

IL-12	Interleukin 12
IL-21	Interleukin 21
IL-23	Interleukin 23
IL-27	Interleukin 27
IL-6	Interleukin 6
IL7R- $\alpha$	Interleukin 7 Rezeptor $\alpha$ (CD127)
IRF4	Interferon regulatory factor 4
IRF8	Interferon regulatory factor 8
KM	Knochenmark
LC	Langerhans-Zellen
Lin	Lineage
LMPP	Lymphoid-primed multipotent progenitors
LPS	Lipopolysaccharide
LSK	Lin <sup>-</sup> Sca-1 <sup>+</sup> c-Kit <sup>hi</sup> HSC
Ly6C	Lymphocyte antigen 6 family member C
Mcl-1	Myeloid-cell-leukemia-1
MDP	Monocyte- dendritic cell progenitors
MHC I	Major histocompatibility complex I
MHC II	Major histocompatibility complex II
MIIC	MHC class II-rich-compartments
moDC	Monocyte-derived DC
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphat buffered Saline
pDC	Plasmazytoide DC
PRR	Pattern-Recognition-Rezeptors
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
RIP 1	Receptor interacting protein 1
RIP 3	Receptor interacting protein 3
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAA	Serumamyloid A
Sca-1	Stem cells antigen 1 (Ly6a)
Sirp $\alpha$	Signal regulatory protein $\alpha$ (CD172a)
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
SSC-A	Side scatter-area
tBID	Truncated BID
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (CD40)
TRADD	TNF-Rezeptor-assoziertes Protein
Tregs	Regulatorische T-Zellen
XCR1	X-C motif chemokine receptor 1



# 1 Einleitung

## 1.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) wurden im Jahre 1973 durch Ralf Steinman und Zanvil Cohn in lymphatischen Geweben von Mäusen entdeckt und charakterisiert (Steinman and Cohn, 1973, Steinman and Cohn, 1974). Dendritische Zellen können in lymphatischen und nicht lymphatischen Geweben nachgewiesen werden und lassen sich anhand von Phänotyp und Funktionalität in diverse Subpopulationen unterteilen. Die meisten DC-Populationen im murinen Organismus verbindet die hohe Ausprägung von MHC II (engl.: Major histocompatibility complex II) und dem Integrin CD11c (engl.: Cluster of Differentiation 11c, Integrin  $\alpha$ -X) sowie die Expression von CD45 (Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C) und CD135 (engl.: Fms-like tyrosine kinase 3; Flt3) auf ihrer Oberfläche. Gleichzeitig fehlen ihnen klassische Abstammungs-Marker anderer hämatopoetischer Zellreihen (z.B. Lymphozyten) (Merad et al., 2013). DCs nehmen als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC, engl. für Antigen-presenting cell) eine Schlüsselrolle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem ein. DCs besitzen ein hohes Potential T-Zellen zu aktivieren, sogar im Vergleich mit anderen APCs wie B-Zellen und Makrophagen (Steinman, 1991). Sie beeinflussen die Immunantwort des Organismus durch Sezernierung von Zytokinen und induzieren Toleranz gegenüber Autoantigenen (Banchereau et al., 2000). Trotz der wichtigen Rolle, die DCs im Immunsystem einnehmen, sind viele Jahre vergangen, bis die Tragweite ihrer Bedeutung für das Immunsystem ins Blickfeld der immunologischen Forschung rückte. Ein Grund für die langjährige Skepsis ist die Schwierigkeit DCs von anderen myeloischen und lymphatischen Zellreihen abzugrenzen. Denn sowohl in Abstammung, Funktionalität und Phänotyp teilen DCs nach heutigem Kenntnisstand einige Gemeinsamkeiten mit anderen Zellen des Immunsystems. Ebenso fällt die eindeutige Unterteilung dieser heterogenen Population in Subpopulationen mit verschiedenen Funktionen und phänotypischen Merkmalen

auch heutzutage immer noch schwer (Merad et al., 2013, Schraml and Reis E Sousa, 2015, Guilliams et al., 2014).

### 1.1.1 Abstammung und Vorläufer der Dendritischen Zellen

Dendritische Zellen stammen wie alle im Knochenmark (KM) gebildeten Zellen von Hämatopoetischen Stammzellen (HSC) ab (Jordan and Lemischka, 1990). Besonders im Zentrum der Betrachtung stehen hierbei Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>hi</sup> HSC (LSK). Lin<sup>-</sup> bedeutet, dass diese Zellen (noch) keine Oberflächenantigene exprimieren, die typisch und/oder definierend für reife Zellen von hämatopoetischer Abstammung wären. Die LSK bilden den aktivsten Teil der HSC in Bezug auf die Differenzierung in weitere hämatopoetische Vorläufer (Ikuta and Weissman, 1992, Li and Johnson, 1995, Spangrude et al., 1988). Die weitere Differenzierung der HSC bis zur Aufteilung der Vorläufer in myeloide und lymphoide Zellreihe ist noch nicht ganz geklärt. Es existieren verschiedene Hypothesen hierzu. Eine Hypothese besagt, dass die HSC sich in Multipotente Vorläuferzellen differenzieren, die dann entweder den Weg der myeloiden oder den der lymphoiden Zellreihe einschlagen (Reya et al., 2001). Eine alternative Hypothese diskutiert eine Differenzierung von HSC in Vorläuferzellen von Erythro- und Megakaryozyten oder in sogenannte lymphoid-primed multipotent progenitors (LMPP, engl. für „lymphoid vorbestimmte multipotente Vorläufer“). Diese LMPP differenzieren sich dann sowohl in Vorläufer der myeloiden als auch der lymphoiden Zellreihe (Adolfsson et al., 2005). Letztendlich differenzieren sich multipotente Stammzellen zu einem Zeitpunkt in frühe lymphoide und myeloische Vorläufer. Die frühen Vorläufer der lymphoiden Zellreihe sind die common lymphoid progenitors (engl. für „gemeinsame lymphoide Vorläufer“, CLP), die der myeloiden Zellreihe sind common myeloid progenitors (engl. für „gemeinsame myeloide Vorläufer“, CMP). CLPs zeigen sich als Lin<sup>-</sup>Flt3<sup>+</sup>IL7R- $\alpha$ <sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Zellen (Kondo et al., 1997) und CMPs werden als Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>FcgR<sup>low</sup> Zellen phänotypisch charakterisiert (Akashi et al., 2000). DCs und ihre Vorläufer differenzieren sich sowohl aus CLP als auch aus CMP. Hierbei generieren CLPs vermehrt thymusständige DCs und CMPs sind effektiver milzständige und Lymphknoten- DCs zu generieren (Manz et al., 2001, Kondo et al., 2001, Traver

et al., 2000). CMPs differenzieren sich weiter in gemeinsame Vorläufer von DCs und Monozyten, die sogenannten monocyte-dendritic cell progenitors (MDP, engl. für „Monozyten-Dendritische Zellen Vorläufer“). Diese Zellen werden phänotypisch als  $\text{Lin}^{-}\text{c-kit}^{+}(\text{CD117})\text{CX3CR1}^{+}$  charakterisiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Differenzierungspotenzial von MDPs auf Makrophagen und DCs beschränkt ist (Fogg, 2006). Die weitere Differenzierung in common dendritic cell precursors (CDP, engl. für gemeinsame Vorläufer der Dendritischen Zellen) bedeutet den Verlust des Differenzierungspotenzials in Makrophagen. CDPs zeigen phänotypisch nur geringe Unterschiede zu MDPs. Sie werden phänotypisch als  $\text{Lin}^{-}\text{c-kit}^{\text{int}}\text{Flt3}^{+}(\text{CD135})\text{M-CSFR}^{+}(\text{CD115})$  definiert. Sie prägen also c-kit in geringerem Maße als MDPs aus und exprimieren darüber hinaus noch M-CSFR auf ihrer Oberfläche. Die phänotypischen Unterschiede zu MDPs und die Beschränkung der Differenzierung auf DCs konnte sowohl in vivo als auch in vitro nachgewiesen werden (Onai et al., 2007). CDPs differenzieren sich weiter in Vorläufer von plasmazytoiden DCs (pDCs) und konventionelle DCs (cDCs, engl.: conventional DCs). Diese werden als pre-DCs bezeichnet (Naik et al., 2007). In diesen Stadien verlassen die Zellen das Knochenmark und migrieren über das Blut zu den Geweben ihrer Bestimmung überall im Organismus (Liu et al., 2009, O’Keeffe et al., 2003).

### 1.1.2 Subpopulationen der Dendritischen Zellen

Dendritische Zellen sind keine homogene Familie von Zellen, sondern sie unterscheiden sich je nach Funktion und Gewebe. Mittlerweile konnten verschiedene Subpopulationen nach Phänotyp, Organ bzw. Gewebe und Funktion abgegrenzt werden. Doch die genaue Zuordnung und Nomenklatur der DCs und ihrer Subpopulationen bietet weiterhin Unklarheiten. Es bestehen verschiedene Ansätze zur systematischen Einteilung Dendritischer Zellen. Einige Ansätze versuchen die Einteilung der DC-Subpopulationen durch die Einführung von Nummerierungssystemen zu vereinfachen (Rissoan, 1999, Guilliams et al., 2014). Andere Ansätze versuchen eine Unterteilung anhand des Aufenthaltsortes der DCs vorzunehmen und teilen DCs darüber hinaus anhand der exprimierten Antigene auf ihrer Zelloberfläche ein (Merad et al., 2013). Gemeinsamkeiten der

verschiedenen Ansätze sind eine grobe erste Unterteilung der DCs in pDCs und cDCs. Ebenfalls besteht Einigkeit darüber, dass zur Einteilung von DCs mehrere Kriterien herangezogen werden müssen. Hierbei werden Abstammung, extrazellulärer Phänotyp sowie differenzierungskritische Transkriptionsfaktoren von den meisten Ansätzen als Kriterien benannt (Schraml and Reis E Sousa, 2015, Merad et al., 2013, Guilliams et al., 2014).

#### *1.1.2.1 DC-Subpopulationen in lymphatischen Geweben*

In lymphatischen Geweben, besonders in der Milz und dem Thymus, findet sich die größte Dichte an DCs im Organismus. Aufgrund ihrer Abstammung, ihrer Funktionalität sowie ihrer Expression von Transkriptionsfaktoren und Oberflächenantigenen können die DCs in lymphatischen Organen in unterschiedliche Subpopulationen unterteilt werden. An dieser Stelle möchte ich mich auf die Subpopulationen in der murinen Milz fokussieren. In der Milz sind drei Subpopulationen von cDCs bekannt. Phänotypisch unterscheidet man  $CD4^-CD8^+CD11b^-Dec-205^+$ ,  $CD4^+CD8^-CD11b^+Dec-205^-$  und  $CD4^-CD8^-CD11b^+Dec-205^-$  cDCs (Vremec et al., 2000, Kamath et al., 2000). In anderen Quellen werden die milzständigen cDCs jedoch nur in zwei Subpopulationen eingeteilt  $CD8^+$  und  $CD8^-$  DCs (Merad et al., 2013, Miller et al., 2012). Als unterscheidendes phänotypisches Merkmal wird hier also die Expression des transmembranösen Glykoproteins CD8 auf der Zelloberfläche der cDCs herangezogen (Nussenzweig et al., 1981, Vremec et al., 1992). Im Falle der  $CD8^+$  cDCs handelt es sich meistens um ein  $CD8 \alpha/\alpha$ -Homodimer und nur seltener um das, für T-Zellen typische,  $CD8 \alpha/\beta$  Heterodimer. Ein Unterschied in der Funktionalität dieser beiden Varianten konnte jedoch nicht beobachtet werden (Vremec et al., 1992).  $CD8\alpha^+$  DCs sind neben der Subpopulation in der Milz auch in LK und im Thymus vorhanden. (Vremec and Shortman, 1997). Humane DCs exprimieren kein CD8 (Winkel et al., 1994). Zwar scheint CD8 für die Funktionalität und Entwicklung von murinen DCs keine Notwendigkeit zu besitzen, es bietet sich jedoch als phänotypisches Merkmal zur Charakterisierung der murinen DC-Subpopulation an (Kronin, 1997, Saunders, 1996).  $CD8^+$  DCs verfügen über die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation. Das bedeutet sie präsentieren prozessierte,

extrazelluläre Antigene sowohl über ihren MHC-II- als auch über ihren MHC-I-Komplex. So sind sie in der Lage neben naiven  $CD4^+$  auch naive  $CD8^+$  T-Lymphozyten zu aktivieren (Shortman and Heath, 2010, den Haan et al., 2000). Eine Funktion, die gleichermaßen bei Immunitäts- und Toleranzentwicklung relevant ist (Merad et al., 2013). Die Subpopulation der  $CD8^+$  DCs exprimiert ebenfalls den Chemokinrezeptor XCR1 (engl.: X-C motif chemokine receptor 1) auf ihrer Zelloberfläche und ist in ihrer Differenzierung auf die Transkriptionsfaktoren BATF3 (engl.: basic leucine zipper ATF-like transcription factor 3) und IRF8 (engl.: Interferon regulatory factor 8) angewiesen (Miller et al., 2012) (Bachem et al., 2012). Weiterhin wird das Zytokin Flt3L (engl.: FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) zur Differenzierung von  $CD8^+$  cDCs benötigt (Waskow et al., 2008).  $CD8^+$  DCs werden in der DC-Systematik von Guilliams et al. zu den cDC 1 gezählt (Guilliams et al., 2014).

Die Einteilung der  $CD8^-$  cDCs in der Milz in eine heterogene Subpopulation oder zwei Subpopulationen ist noch nicht abschließend geklärt. Quellen, die sich auf die Hypothese einer gemeinsamen heterogenen Population beziehen, begründen dies durch die Expression von CD11b auf der Zelloberfläche von allen  $CD8^-$  cDCs in lymphatischen Organen (Merad et al., 2013). Weiterhin lassen sich die  $CD11b^+$  cDCs durch die Expression des Integrins CD172a (Sirp $\alpha$ ; engl.: Signal regulatory protein  $\alpha$ ) charakterisieren (Proietto et al., 2008). Trotzdem steht die Hypothese der zwei unterschiedlichen Populationen weiter zur Diskussion. Diese wird anhand der differentiellen Ausprägung des endothelial cell specific adhesion molecule (ESAM, engl. für endothelzellspezifisches Adhäsionsmolekül) gestützt, denn ein Teil der  $CD11b^+$  cDCs exprimiert ESAM in hohen Maßen auf der Zelloberfläche ( $ESAM^{hi}$ ), der andere Teil exprimiert ESAM nur geringfügig ( $ESAM^{lo}$ ) (Kanakano et al., 2011). Wie oben bereits erwähnt wurde, unterscheiden sich die  $CD11b^+$  cDCs außerdem bezüglich ihrer Ausprägung von CD4, mit einer  $CD4^+$  und einer  $CD4^-$  Fraktion (Vremec et al., 2000). Interessanterweise exprimieren  $CD11b^+$   $ESAM^{hi}$  cDCs eher CD4 auf ihrer Oberfläche als  $CD11b^+$   $ESAM^{lo}$  cDCs (Kanakano et al., 2011). Theorien, die versuchen eine Erklärung für die Heterogenität der  $CD11b^+$  cDCs zu finden, vermuten, dass diese auf unterschiedliche Abstammungen der cDCs beruhen



könnten. So könnte die Ausprägung des CD4 auf eine lymphoide Abstammung zurückzuführen sein.

Unabhängig von der phänotypischen Heterogenität zeigen sich jedoch CD11b<sup>+</sup> cDCs in ihrer Differenzierung abhängig von der Bereitstellung des Transkriptionsfaktors Interferon-regulatorischer Faktor 4 (IRF4) (Suzuki et al., 2004). Die IRF4 abhängigen CD11b<sup>+</sup> cDCs werden in der Nomenklatur von Guilliams et al. zu den cDC 2 gezählt (Guilliams et al., 2014).

#### *1.1.2.2 DC-Subpopulationen in nicht-lymphatischen Geweben*

Dendritische Zellen außerhalb der lymphatischen Organe lassen sich nach heutigem Kenntnisstand in mehrere Subpopulationen unterteilen: CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> CX3CR1<sup>-</sup> DCs , CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> DCs, die epidermalen Langerhans Zellen (LC) und plasmazytoide DCs (pDCs) (Merad et al., 2013). In der Laminae propriae mucosae von Hohlorganen (vor allem in der Darmmukosa) existiert außerdem eine CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CX3CR1<sup>-</sup> Subpopulation (Bogunovic et al., 2009).

Grundlegend ist festzuhalten, dass unter den cDCs nicht-lymphatischer Gewebe eine Variabilität herrscht, welche sich in Unterschieden von Gewebe zu Gewebe und von Population zu Population niederschlägt (Helft et al., 2010). Da die cDCs außerhalb der lymphatischen Organe nicht Inhalt dieser Arbeit sind, werden sie im nächsten Abschnitt nicht detailliert in ihrer gesamten Variabilität besprochen, sondern nur ein grober Überblick gegeben.

Die CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> CX3CR1<sup>-</sup> Subpopulation wird phänotypisch durch die Expression von CD103 auf ihrer Zelloberfläche charakterisiert. Bei CD103 handelt es sich um das Integrin  $\alpha E\beta 7$ , welches eine Rolle in der Bindung mit T-Lymphozyten spielt (Cepek et al., 1994). CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> cDCs stellen das Pendant zu den CD8<sup>+</sup> cDCs in den lymphatischen Organen dar. Ähnlich wie diese sind sie in ihrer Differenzierung von den Transkriptionsfaktoren BATF3 (Hildner et al., 2008) sowie IRF8 (Ginhoux et al., 2009) abhängig und auf die Bereitstellung von Flt3-L angewiesen (Ginhoux et al., 2009). Sie differenzieren sich wie CD8<sup>+</sup> cDCs ebenfalls aus pre-cDCs (Ginhoux et al., 2009). Ebenso wie CD8<sup>+</sup> cDCs verfügen sie über die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation (s. Kapitel

1.1.2.1.) (Bedoui et al., 2009). Sie sind überall im Körper zu finden, kommen aber besonders häufig in den Laminae propriae mucosae von Epithelien vor, wie z.B. in der Lunge (Sung et al., 2006) und im Darm (Annacker et al., 2005). Die CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> cDCs im Darm wandern nach dem Antigenkontakt in die mesenterialen Lymphknoten (MLN) um dort T-Lymphozyten zu aktivieren (Schulz et al., 2009). Identische Funktionen werden auch in anderen Geweben und Organen beobachtet (Worbs et al., 2017).

CD11b<sup>+</sup> cDCs des nicht lymphatischen Gewebes stellen sich ebenso heterogen dar wie die CD11b<sup>+</sup> cDCs der lymphatischen Organe. Hinzu kommt, dass diese Heterogenität ihrer Ausprägung von Gewebe zu Gewebe variiert (Merad et al., 2013, Bogunovic et al., 2009, Langlet et al., 2012). In der Lamina propria des Darms scheinen zum Beispiel die Ausprägung von CD103 und CX3CR1 Merkmale zur Unterscheidung der CD11b<sup>+</sup> cDCs zu sein.

CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> DCs übernehmen hier die wichtige Funktion der Erkennung und Phagozytose von Antigenen aus dem Lumen von Hohlorganen (Niess, 2005). CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-</sup> cDCs induzieren dagegen besonders effektiv die Expression von Proteinen auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten, welche das Homing (engl. für heimkehren) dieser in die Darmmukosa fördern (Johansson-Lindbom et al., 2005). Des Weiteren stimulieren sie die periphere Generierung von Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Lymphozyten, die eine wichtige Rolle in der Toleranzentwicklung gegenüber Antigenen einnehmen (Jaensson et al., 2008). Die cDC-Populationen außerhalb des lymphatischen Gewebes werden wegen ihrer Migration in die drainierenden Lymphknoten auch als migrierende DCs (engl.: „migratory DCs“) bezeichnet (Worbs et al., 2017).

Die Langerhans-Zellen (LC) der Epidermis nehmen eine Sonderrolle unter den DCs ein. Sie wurden bereits 1868 im Stratum Spinosum der Epidermis durch den Pathologen Paul Langerhans entdeckt, lange bevor Steinman und Cohn DCs im Jahre 1973 aus lymphatischen Organen isolierten (Steinman and Cohn, 1973). Langerhans ordnete die LCs noch wegen ihrer langen Zellfortsätze dem Nervensystem zu (Langerhans, 1868). Erst 1985 wurden sie durch Schuler et al. als Subpopulation der DCs identifiziert (Schuler et al., 1985). Verglichen mit cDCs der Dermis prägen sie MHC II und CD11c in geringeren Verhältnissen aus

(Merad et al., 2008). Weiterhin werden sie über die Expression von CD45, Langerin (CD207), E-cadherin (Tang et al., 1993), EpCAM (Borkowski et al., 1996) und CD205 (Inaba et al., 1995) definiert. Anders als die cDCs differenzieren sich LCs nicht aus den im Blut zirkulierenden Vorläufern. Stattdessen werden die ersten LCs aus Erythro-Myeloiden Progenitoren (EMP) gebildet, die aus dem embryonalen Dottersack stammen. Die Regeneration der LCs scheint dann im weiteren Leben aus lokalen Vorläuferzellen zu erfolgen oder bei Inflammation aus Monozyten (Malissen et al., 2014). LCs bilden ein epidermales Netzwerk aus ungefähr 700 LCs/mm<sup>2</sup> Haut und stellen die erste immunologische Barriere unseres Organismus gegen fremde Antigene und potenzielle Gefahren dar (Merad et al., 2008).

#### *1.1.2.3 Plasmazytoide Dendritische Zellen*

Plasmazytoide DCs (pDC) wurden durch Nakano et al., Asselin-Paturel et al. und Björck 2001 im murinen Organismus identifiziert (Nakano et al., 2001, Björck, 2001, Asselin-Paturel et al., 2001). Sie werden anhand der Expression der Oberflächenantigene CD11c, B220 und Ly6G/C charakterisiert. Die Expression des Integrins CD11c ist zwar vorhanden, jedoch im Vergleich mit cDC in geringerem Maße (Asselin-Paturel et al., 2001, Nakano et al., 2001). Die pDCs teilen gemeinsame Vorläufer mit den cDCs. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl MDPs (Liu et al., 2009, Auffray et al., 2009) als auch CDPs über ein Differenzierungspotenzial für pDCs verfügen. CDPs stellen sich dabei als letzter gemeinsamer Vorläufer mit den cDCs dar (Onai et al., 2007, Naik et al., 2007). Denn im Gegensatz zu cDCs differenzieren sich die pDCs über die pre-pDCs (Onai et al., 2013, Toyama-Sorimachi et al., 2005). Ebenso wie cDCs sind auch pDCs auf Flt3L in ihrer Differenzierung angewiesen (D'Amico and Wu, 2003, Karsunky et al., 2003, Onai et al., 2006, Waskow et al., 2008). Plasmazytoide Zellen residieren vor allem in lymphatischen Geweben wie der Milz oder den Lymphknoten (O'Keeffe et al., 2002). Die pDCs sezernieren in Reaktion auf virale Stimulation große Mengen von Interferon  $\alpha$  (Asselin-Paturel et al., 2001, Dalod et al., 2002, Asselin-Paturel et al., 2003, Krug et al., 2004, Barchet et al., 2005). Im Vergleich mit den cDCs zeigen pDCs ein geringeres Potenzial Antigene zu

präsentieren (Grouard et al., 1997). Jedoch spielen sie ebenso eine Rolle in der Toleranzentwicklung des Immunsystems (Martín et al., 2002, Boonstra et al., 2003, Gehrie et al., 2010).

#### *1.1.2.4 Dendritische Zellen monozytären Ursprungs*

Neben den cDCs, LCs und pDCs konnten ebenfalls DCs monozytären Ursprungs entdeckt werden. Diese aus Monozyten differenzierten DCs werden moDCs (engl.: monocyte-derived DCs) genannt (León and Ardavín, 2008). Monozyten teilen gemeinsame Vorgänger mit Dendritischen Zellen. Sie können im murinen Organismus anhand der Ausprägung von Ly6C (engl.: lymphocyte antigen 6 family member C) auf ihrer Oberfläche in Ly6C<sup>hi</sup> (hohe Expression von Ly6C) und Ly6C<sup>lo</sup> (niedrige Expression von Ly6C) Monozyten eingeteilt werden (Gordon and Taylor, 2005). Hier differenzieren sich vor allem Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten zu moDCs (León et al., 2007, Guilliams et al., 2009). Eine Differenzierung von Monozyten in DCs wurde teilweise im steady state beobachtet (Jakubzick et al., 2008, Varol et al., 2007). In den meisten Fällen und in besonders hohem Maße geschieht dies aber im Falle von inflammatorischen Vorgängen, zum Beispiel bei Infektionen mit den verschiedensten Mikroorganismen (León et al., 2007, Serbina et al., 2003, Hohl et al., 2009). Aber auch autoimmune Ursachen der Inflammation können zu einer vermehrten Differenzierung von Monozyten in moDCs führen (Siddiqui et al., 2010). Ebenfalls führt das, in Vakzinen häufig genutzte, Adjuvans Alum zu einer verstärkten Differenzierung von Monozyten in moDCs (Kool et al., 2008). Die Rekrutierung der Monozyten aus dem Knochenmark erfolgt abhängig von CCR2 (engl.: C-C chemokine receptor type 2) (Serbina and Pamer, 2006). Ebenso wird das Einwandern von Monozyten in die allergisch-inflammatorische Lunge durch CCR2-Expression vermittelt (Robays et al., 2007). Die Migration aus dem Blut in das inflammatorische Gewebe der Haut erfolgt abhängig von CCR6 (engl.: C-C chemokine receptor type 6) (Ravindran et al., 2007). Monozyten sind MHC II<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup>, nach ihrer Differenzierung zeigen sich die moDCs phänotypisch als MHC II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>. Teilweise exprimieren sie auch CD11b<sup>+</sup>, wodurch es zur Verwechslung mit CD11b<sup>+</sup> cDCs kommen kann. Jedoch

exprimieren moDCs auch nach der Differenzierung noch Ly6C, was zur Unterscheidung genutzt werden kann (León and Ardavin, 2008).

Nach Antigen-Kontakt reifen moDCs ähnlich wie cDCs (s. 1.1.3. und 1.1.4.). Es folgt ebenfalls eine erhöhte Expression von MHC II und CD11c auf ihrer Zelloberfläche. Ebenso werden costimulatorische Moleküle, wie beispielsweise CD86, vermehrt exprimiert (Tacke et al., 2006). MoDCs sind wie cDCs in der Lage Antigene gegenüber T-Lymphozyten zu präsentieren und diese zu aktivieren (León et al., 2007, Ravindran et al., 2007). Es scheint als seien sie sogar wie CD8<sup>+</sup> cDCs zur Kreuzpräsentation über MHC I fähig (Le Borgne et al., 2006).

Die *in vitro* mit GM-CSF (engl.: Granulozyte-macrophage-colony-stimulating-factor) generierten murinen BMDCs (engl.: Bone marrow dendritic cells) (Inaba et al., 1992) ähneln am ehesten moDCs und werden teilweise als deren Homolog angesehen (Xu et al., 2007, Segura et al., 2013). Trotzdem zeigen andere Arbeiten eine nicht zu unterschätzende Heterogenität der BMDCs (Helft et al., 2015). *In vivo* zeigen Mäuse mit einem Mangel an GM-CSF jedoch keinen Mangel an inflammatorischen moDCs bei Infektion (Greter et al., 2012). Die Rolle von GM-CSF bei der Differenzierung von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten in moDCs ist also noch nicht abschließend geklärt (Lutz et al., 2017).

### 1.1.3 Homöostase und Lebenszyklen von Dendritischen Zellen

Homöostase (altgriech. für „Gleichstand“) bezeichnet einen Zustand des Gleichgewichts in einem offenen und dynamischen System. Der Begriff geht zurück auf den Physiologen Walter B. Cannon (Cannon, 1926).

In Bezug auf Dendritische Zellen bedeutet die Homöostase die Aufrechterhaltung einer adäquaten Zahl an DCs in den verschiedenen Geweben. Diese ist essenziell zur Aufrechterhaltung der Funktionalität des DC-Netzwerkes (Mildner and Jung, 2014). Zu wenige DCs erhöhen das Risiko für Infektionen und Tumorentstehung (Steinman, 1991). Zu viele DCs, zum Beispiel durch verminderte Apoptose, steigern das Risiko für Autoimmunität (Wang et al., 1999, Stranges et al., 2007) und Hypersensitivität bzw. Allergie (Lambrecht, 1996, Lambrecht et al., 1998). Wichtige Mechanismen zur Aufrechterhaltung der DC-

Homöostase sind die Wiederherstellung des DC-Pools durch Vorläuferzellen aus dem Blut, die Zellteilung der DCs und ihr Zelltod bzw. die Emigration von DCs aus peripheren Geweben in lymphatische Organe (Merad and Manz, 2009, Liu et al., 2007, Worbs et al., 2017, Roake et al., 1995).

#### *1.1.3.1 Homöostase und Lebenszyklus von DCs im steady state*

Im sogenannten „Steady State“ (engl. für „stabiler Zustand“), also dem Zustand, in dem der Organismus keiner akuten Bedrohung durch inflammatorische Prozesse ausgesetzt ist, entwickeln sich DCs, wie oben beschrieben aus der Vorstufe der pre-DCs. Diese verlassen das Knochenmark über das Blut und wandern durch das Gefäßsystem in verschiedene Gewebe des Organismus (s. Kapitel 1.1.1). Die Differenzierung von pre-DCs in DCs erfolgt im jeweiligen Zielgewebe in DCs verschiedener Subpopulationen (O’Keeffe et al., 2003). Grundsätzlich kann nun zwischen zwei Lebenszyklen unterschieden werden. Dem klassischen Lebenszyklus der migrierenden DCs in den nichtlymphatischen Geweben sowie den Lebenszyklus der in den lymphatischen Organen ansässigen DCs. Migrierende DCs halten sich in den verschiedensten peripheren Geweben auf, in diesem Stadium werden sie als unreife DCs bezeichnet. Im unreifen Zustand sind sie nicht in der Lage, T-Lymphozyten zu aktivieren, aber sie zeigen eine hohe phagozytotische Aktivität (Schuler and Steinman, 1985). Bei Kontakt zu Mikroorganismen oder deren Bestandteilen (Janeway, 1989), aber auch bei Kontakt zu endogenen Mediatorstoffen (Matzinger, 1994) erfahren diese DCs eine dramatische Veränderung ihres Phänotyps und ihrer Funktionalität. Dieser Vorgang wird als Maturation bzw. Reifung bezeichnet (Schuler and Steinman, 1985, Romani et al., 1989, Puré et al., 1990). Präziser gesagt erhöhen die DCs ihre Expression von MHC II und sogenannten costimulatorischen Molekülen, wie CD40 (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor, TNFR), CD86 (B7-2) und CD80 (B7-1). All diese Moleküle sind zur Interaktion mit naiven T-Zellen und für deren Aktivierung erforderlich (Schuler and Steinman, 1985). Zusätzlich erhöht sich die Expression von akzessorischen Oberflächenmolekülen, die zur Adhäsion mit T-Lymphozyten benötigt werden, zum Beispiel CD54 (ICAM-1) (Scheeren et al., 1991). Des Weiteren reduziert sich die phagozytotische Aktivität

der DCs und trotz der erhöhten MHC-II-Expression werden keine neuen Antigene mehr präsentiert (Young et al., 2007, Henri et al., 2001). Die DCs wandern zu den ableitenden Lymphknoten des jeweiligen Gewebes (Roake et al., 1995, MacPherson et al., 1995, Macatonia et al., 1987). Hierzu erhöht sich die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 (engl. C-C-chemokine receptor type 7) der DCs. Dieser interagiert mit seinem Liganden CCL21 (engl.: C-C-chemokine ligand 21) auf den Endothelzellen der Lymphgefäße und ist so essenziell für das Erreichen der Lymphknoten (Weber et al., 2013, Ohl et al., 2004). In den Lymphknoten präsentieren sie die phagozytierten und prozessierten Antigene mithilfe von MHC II und costimulatorischen Molekülen den vorhandenen naiven T-Zellen. Passende T-Zellen werden so stimuliert und aktiviert (Schuler and Steinman, 1985). Im steady state findet die Migration der DCs nicht nur nach Kontakt mit Fremdanitigenen statt, sondern ebenso nachdem die DCs Autoantigene bzw. apoptotische Zellen endozytiert haben. Die Migration der DCs zeigte sich im Vergleich zwischen Mäusen in normaler und in besonderer keimarmer Haltung identisch. Sie kann also als konstitutives Merkmal des Lebenszyklus von DCs in peripheren Geweben bezeichnet werden (Huang et al., 2000, Scheinecker et al., 2002). Nachdem DCs die Antigene gegenüber den T-Lymphozyten präsentiert haben, sterben sie durch Apoptose um die Immunreaktion zu dämpfen und Platz für nachrückende DCs zu machen (Matsue and Takashima, 1999). Hierbei kann sich die Überlebensdauer einzelner Subpopulationen unterscheiden. Zum Beispiel überlebten migrierte dermale CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> cDCs in den Lymphknoten im steady state 4-4,5 Tage, dermale CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> cDCs für 2 Tage (Tomura et al., 2015).

Die in den lymphatischen Geweben ansässigen cDCs befinden sich bereits in den Lymphknoten und der Milz, dort haben sie sich aus eingewanderten pre-DCs differenziert. Liu et al. konnten zeigen, dass pro Minute ungefähr 71 Vorläufer Dendritischer Zellen in die Milz einwandern (Liu et al., 2007). Die ansässigen cDCs im sekundären lymphatischen Gewebe zeigen einen unreifen Phänotyp (Wilson et al., 2003). In Lymphknoten sind die CD8<sup>+</sup> cDCs hauptsächlich im T-Zell-Areal zu finden, während CD4<sup>+</sup> cDCs und CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup> cDCs in der Marginal-Zone akkumulieren (McLellan et al., 2002, Pulendran et al., 1997).

Im steady state üben die ansässigen unreifen DCs dort eine tolerogene Funktion aus (Steinman et al., 2003, Belz et al., 2002). Ebenso können sie im Blut zirkulierende Antigene endozytieren, um diese naiven T-Lymphozyten zu präsentieren (Pooley et al., 2001, Belz et al., 2004). CD8<sup>+</sup> cDCs können auch prozessierte Antigene von immigrierenden maturierten cDCs übernehmen. Nach der Aufnahme von Fremdanitigenen reifen sie wie die migrierten cDCs (Henri et al., 2001) und präsentieren die exogenen Antigene über MHC II und über MHC I (wegen ihrer Fähigkeit zur Kreuzpräsentation). So werden naive CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten aktiviert (Allan et al., 2006, Geurtsvankessel et al., 2008). Unreife lymphatische DCs haben eine Halbwertszeit von 1,5 - 2,9 Tagen. Präsentieren sie jedoch Antigene, können sie ihre Lebensspanne durch eine limitierte Anzahl von Zellteilungen auf eine Zeit von 10-14 Tagen verlängern, hierbei übernehmen die Tochterzellen die präsentierten Antigene. Nach maximal 14 Tagen zeigten sich jedoch alle DCs in lymphatischen Geweben ersetzt (Liu et al., 2007).

#### *1.1.3.2 Homöostase und Lebenszyklus von DCs im inflammatorischen Zustand*

Der inflammatorische Zustand eines Gewebes oder des gesamten Organismus zeichnet sich durch die vermehrte Sezernierung von Zytokinen und anderen entzündlichen Mediatoren aus. Dies geschieht meistens im Zuge von vermehrtem zellulären Stress durch Infektion, Unterversorgung und chemische oder mechanische Reizung. Dieser inflammatorische Zustand hat entscheidenden Einfluss auf die Homöostase Dendritischer Zellen (Worbs et al., 2017, Merad and Manz, 2009, Merad et al., 2013).

In den inflammatorischen Geweben kommt es wegen vermehrter Abwanderung zu einem erhöhten Bedarf an neuen DCs (s. unten). Im inflammatorischen Zustand differenzieren sich DCs nicht nur aus pre-DCs sondern auch aus Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten. So entstehen die sogenannten moDCs (s. 1.1.2.4.). Diese teilen einige Oberflächenmarker mit cDCs und verfügen über ähnliche Funktionen wie die Sezernierung von Zytokinen, Antigenpräsentation und Aktivierung von naiven T-Lymphozyten (León and Ardavín, 2008).



Das inflammatorische Setting führt beispielsweise in der Haut zu einer vermehrten Emigration von CD103<sup>+</sup> cDCs in drainierende Lymphknoten, aber ebenso dort zu einem verkürzten Verbleib von maximal einem Tag (Tomura et al., 2015). Auch in anderen Geweben und Organen kommt es im inflammatorischen Zustand zur vermehrten Migration von DCs zu den Lymphknoten. So transportieren beispielsweise intestinale cDCs vermehrt *Salmonella* sp. in die mesenterialen LK und sorgen so für eine Dissemination der Erkrankung (Voedisch et al., 2009, Uematsu et al., 2006). In der Lunge kommt es in den ersten 24 Stunden einer Infektion mit Influenzaviren zu einer schnellen Welle von DC-Migration in die mediastinalen Lymphknoten (Legge and Braciale, 2003), bei der CD103<sup>+</sup> cDCs die Mehrheit der migrierenden Zellen darstellen (Ho et al., 2011).

Im lymphatischen Gewebe führt ein durch Zytokine hervorgerufenes proinflammatorisches Setting zu einer Aktivierung der ansässigen cDCs. In der Konsequenz ist die tolerogene Funktion herabgesetzt. Nach Aktivierung und Reifung wird außerdem die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation neu aufgenommener Antigene reduziert. Dies kann bei systemischer Inflammation und Aktivierung, wie bei einer Sepsis, in einer Immunschwäche resultieren (Wilson et al., 2006). Ansässige cDCs im lymphatischen Gewebe haben durch limitierte Zellteilungen eine verlängerte Überlebenszeit, wenn sie Antigene präsentieren (Liu et al., 2007).

Aber insgesamt resultiert eine inflammationsbedingte, vermehrte Aktivierung von DCs, in peripherem und lymphatischem Gewebe, in einer erhöhten Apoptoserate (Stranges et al., 2007, Chen et al., 2006).

#### 1.1.4 Schlüsselfunktionen von Dendritischen Zellen

##### 1.1.4.1 *Immunitätsentwicklung*

Treffen DCs in nichtlymphatischen Geweben auf PAMPs (engl.: Pathogen-associated molecular pattern) oder andere Antigene, phagozytieren sie diese. Zentrale Rolle spielen dabei sogenannte Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR, engl. für „Muster-Erkennungs-Rezeptoren“). Zu diesen gehören Toll-like-

Rezeptoren (TLR), C-type-lectin-receptors (CLR engl. für „C-Typ-Lektin-Rezeptoren) und einige weitere (Iwasaki and Medzhitov, 2015). Die Familie der TLR dient dem Erkennen von Fremdanitigenen. Bis zum heutigen Tage sind zehn Arten von TLRs identifiziert, die alle der Erkennung verschiedener Fremdanitigene dienen. So reagieren beispielsweise TLR5 auf das bakterielle Protein Flagellin (Hayashi et al., 2001), TLR4 haben als Liganden LPS (Lipopolysaccharide) (Qureshi et al., 1999) und TLR7 bindet mit Nukleinsäuren viraler Genese (Hemmi et al., 2002). So heterogen die Populationen der DCs auch sind, so heterogen ist auch ihre Ausstattung mit verschiedenen TLRs. Die cDCs der Darmmukosa verfügen unter anderem über eine hohe Zahl an TLR5 (Uematsu et al., 2006). Alle cDCs in lymphatischen Geweben exprimieren TLR1, 2, 4, 6, 8, 9 und zeigen damit eine breit aufgestellte Detektionsfähigkeit der verschiedensten Fremdanitigene (Edwards et al., 2003). Zur Familie der CLRs gehört beispielsweise DEC-205, der auf der Oberfläche vieler DC-Populationen exprimiert wird (Inaba et al., 1995). Die PRRs auf der Oberfläche Dendritischer Zellen spielen neben der Erkennung von Fremdanitigenen auch eine wichtige Rolle bei Aktivierung und Maturation der DCs (Iwasaki and Medzhitov, 2004). Nachdem nun Fremdanitigene erkannt wurden, werden diese per Endozytose in die Zelle aufgenommen. Dies geschieht über Phagozytose (Inaba et al., 1993, Reis e Sousa et al., 1993), Makropinozytose (Sallusto et al., 1995) oder per rezeptorvermittelter Endozytose beispielsweise durch DEC-205 (Jiang et al., 1995, Wilson and Villadangos, 2005). Hier sind die DCs so effiziente APCs, dass bereits Antigenkonzentrationen im pico- und nanomolaren Bereich ausreichend sind (Sallusto et al., 1995). Durch die einsetzende Reifung bilden die DCs sogenannte „MHC class II-rich compartments“ (MIIC, engl. für MHC Klasse II-reiche Kompartimente) in ihren Endosomen. In diese endosomalen MIIC werden die exogenen Antigene aufgenommen und dort an MHC II-Moleküle gebunden. So werden Antigen-MHC-II-Komplexe gebildet. Die MIIC wandeln sich, noch während des Reifungsprozesses, in nicht-lysosomale Vesikel um und verschmelzen mit der Zellmembran, sodass die Antigen-MHC-II-Komplexe auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Pierre et al., 1997, Cella et al., 1997).

Endogene Antigene werden über Proteasomen prozessiert und anschließend durch den Golgi-Apparat an MHC I gebunden (Wilson and Villadangos, 2005). Wie bereits oben beschrieben werden neben den MHC II-Molekülen noch verschiedene costimulatorische und verschiedene Adhäsionsmoleküle zur Interaktion mit T-Lymphozyten exprimiert. Bei den costimulatorischen Molekülen handelt es sich vor allem um CD80 (B7-1) (Larsen et al., 1992) und CD86 (B7-2) (Hathcock et al., 1993), beides Liganden des Rezeptors CD28/CTLA-4 (engl.: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) auf der Oberfläche von T-Lymphozyten. Ein weiteres wichtiges costimulatorisches Molekül, das in der Reifung verstärkt exprimiert wird, ist CD40. CD40 interagiert mit seinem Liganden CD154 bei der Aktivierung der T-Lymphozyten durch DCs (Grewal et al., 1995). Gleichzeitig können unreife DCs aber auch über CD40 aktiviert werden. Dies erfolgt vor allem über TNF und CD154, das als Ligand auf bereits aktivierten T-Lymphozyten verstärkt exprimiert wird (Miga et al., 2001, Morel et al., 2001). Zusätzlich exprimieren DCs in der Reifung verstärkt akzessorische adhäsive Moleküle auf ihrer Oberfläche zum Beispiel ICAM-1 (CD54), die zu einer verbesserten Bindung zwischen den Zellen führen (Scheeren et al., 1991). Die gereiften DCs können nun T-Lymphozyten in den Lymphknoten des jeweiligen Gewebes aktivieren. Ihre Fähigkeit, neue Antigene aufzunehmen und Antigen-MHC-II-Komplexe zu bilden, nimmt jedoch mit Abschluss der Reifung stark ab (Schuler and Steinman, 1985). Migrierte DCs aus peripheren Geweben und CD8<sup>-</sup> cDCs aus lymphatischen Geweben präsentieren die exogenen Antigene über MHC II ausschließlich naiven CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Skokos et al., 2007). T-Lymphozyten mit dem passenden T-Zell-Rezeptor differenzieren sich nach Aktivierung zu T-Helferzellen und proliferieren, um eine gezielte Immunreaktion einzuleiten (Banchereau et al., 2000). CD8<sup>+</sup> cDCs sind außerdem zur Kreuzpräsentation fähig und präsentieren exogene Antigene zusätzlich über MHC I. So sind sie in der Lage ebenfalls naive CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die über den passenden T-Zell-Rezeptor verfügen, zu aktivieren (den Haan et al., 2000, Pooley et al., 2001, Schnorrer et al., 2006). Diese differenzieren sich in zytotoxische T-Zellen und proliferieren. Zusätzlich spielen CD8<sup>+</sup> DCs eine

zentrale Rolle bei der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen mit viralen oder anderen intrazellulären Antigenen (Belz et al., 2004).

Nach dem Kontakt mit Fremdanitigenen und Reifung sezernieren DCs außerdem verschiedene inflammatorische Botenstoffe, Zytokine genannt. Zu diesen gehören unter anderem IL-12 (Interleukin 12) (Kelsall et al., 1996), IL-6 (Interleukin 6) (Lin et al., 2016), TNF (Onishi et al., 2004, Serbina et al., 2003) und Weitere. Durch diese inflammatorischen Mediatoren werden DCs in der Umgebung aktiviert. Ebenso wirken sie als Chemokine, die DCs und andere Zellen des Immunsystems zum Ort der Infektion leiten (Le Borgne et al., 2006, Rose et al., 2010). Zusätzlich beeinflussen die DCs durch diese Botenstoffe die Differenzierung der aktivierten T-Lymphozyten. Beispielsweise begünstigen erhöhte Konzentrationen von IL-12 p70 und IFN- $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ) die Differenzierung in T-Helferzellen 1 (Macatonia et al., 1995). Erhöhte Konzentrationen von IL-6, IL-21, IL-23 und TGF- $\beta$  (engl.: Transforming Growth Factor  $\beta$ ) induzieren dagegen die Differenzierung in T-Helferzellen 17 (Korn et al., 2009).

#### *1.1.4.2 Toleranzentwicklung*

Dendritische Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Toleranzentwicklung gegenüber von Auto- und Alloantigenen (Ohnmacht et al., 2009). Sowohl bei der zentralen Toleranz (Klein et al., 2014) als auch bei der peripheren Toleranz (Hawiger et al., 2001) sind DCs von nicht unerheblicher Relevanz.

Hierzu verfügen sie über drei Mechanismen: Die Deletion selbstreaktiver T-Lymphozyten (Bonasio et al., 2006), das Einleiten von Anergie in T-Lymphozyten (Hawiger et al., 2001) und die Induktion der Differenzierung von naiven in regulatorische T-Zellen (Tregs) (Liston et al., 2008).

Im Zuge der zentralen Toleranzentwicklung im Thymus präsentieren cDCs Autoantigene gegenüber naiven T-Lymphozyten und induzieren eine Deletion autoreaktiver Zellen. Sie sind also ein wichtiger Teil der negativen Selektion (Bonasio et al., 2006). Die Deletion verläuft durch induzierte Apoptose, Zielrezeptoren gehören hierbei häufig der Familie der TNF-Rezeptoren an, beispielsweise Fas-Rezeptoren (engl.: FS-7-associated surface antigen)

(Hughes et al., 2008, Oh et al., 2012). Ebenfalls beeinflussen sie im Thymus die Differenzierung von naiven T-Lymphozyten in natürliche antigenspezifische Tregs (Proietto et al., 2008). Im Thymus ansässige cDCs stimulieren hierbei die Differenzierung der T-Lymphozyten durch CD70. Die CD70<sup>-</sup> migrierenden DCs induzieren die Differenzierung über einen bis jetzt noch unbekanntem Weg (Coquet et al., 2013).

In peripheren lymphatischen Organen induzieren DCs Apoptose oder Anergie in autoreaktiven T-Lymphozyten, außerdem stimulieren sie im steady state naive T-Lymphozyten zur Differenzierung in Tregs. Im steady state werden durch migrierte und ansässige DCs immer wieder Autoantigene gegenüber T-Lymphozyten in den sekundären lymphatischen Organen präsentiert (Huang et al., 2000, Scheinecker et al., 2002). Bei autoreaktiven T-Lymphozyten wird Anergie oder Apoptose induziert (Hawiger et al., 2001, Hughes et al., 2008). Dieser Vorgang verlangt eine Interaktion der DCs mit den T-Lymphozyten über den T-Zell-Rezeptor (Skokos et al., 2007). Die DCs müssen für die direkte Interaktion also ebenso einen Reifungsprozess durchlaufen haben, ähnlich wie zur Immunitätsentwicklung. Diese Reifung ist (zumindest im Falle von XCR1<sup>+</sup> cDCs) jedoch nicht abhängig von Fremdantigenkontakt oder endogenen inflammatorischen Signalen, sondern vielmehr Teil eines homöostatischen Prozesses (Ardouin et al., 2016).

Neben der Induktion von Anergie oder Deletion von autoreaktiven T-Zellen können DCs ebenfalls naive T-Zellen zur Differenzierung in Tregs stimulieren. Dies geschieht vor Allem durch die Sezernierung von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 (Interleukin 10), TGF- $\beta$  und IL-27 (Interleukin 27) (Roncarolo et al., 2001, Apetoh et al., 2010, Jones et al., 2016). Werden naive T-Lymphozyten in einem durch diese Zytokine geprägten Milieu durch DCs aktiviert, differenzieren sie sich zu Treg1 und induzierten FoxP3<sup>+</sup> Tregs (Yamazaki et al., 2008, Gandhi et al., 2010). Zentrale Rolle bei der Aktivierung dieser T-Zellen spielen vor allem ansässige CD8<sup>+</sup> CD205<sup>+</sup> cDCs des lymphatischen Gewebes. Ansässige CD11b<sup>+</sup> cDCs verstärken dabei die Aktivierung und ebenfalls die Proliferation bereits vorhandener FoxP3<sup>+</sup> Tregs (Yamazaki et al., 2008). IL-10, das von nahezu allen Zellen des Immunsystems

produziert wird (Saraiva and O'Garra, 2010), fördert außerdem auch die tolerogene Funktion von DCs und hemmt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Moore et al., 2001, Steinbrink et al., 1997).

Exogene Faktoren können ebenfalls auf die tolerogene Funktion der DCs einwirken und spielen eine besondere Rolle in der Entwicklung von Toleranz gegenüber oralen Antigenen. Beispiele wären hier Retinolsäure und Tryptophan. Retinolsäure unterstützt die, durch CD103<sup>+</sup> cDCs initiierte, Differenzierung zu FoxP3<sup>+</sup> Tregs in der Darmmukosa (Mucida et al., 2007). Außerdem hat die Retinolsäure Einfluss auf die Homöostase von CD11b<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> cDCs im Darm und CD11b<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> Esam<sup>hi</sup> cDCs in der Milz (Klebanoff et al., 2013).

Die Aminosäure Tryptophan wird durch Bakterien der Darmflora in Agonisten des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) metabolisiert. Dieser Rezeptor befindet sich auf der Oberfläche Dendritischer Zellen und stimuliert durch die Agonisten die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und IL-27 (Zelante et al., 2013, Quintana and Sherr, 2013).

## 1.2 Arten des Zelltodes und ihre Bedeutung für Homöostase und Funktion Dendritischer Zellen.

Es sind verschiedene Arten des Zelltodes bekannt. Sie beeinflussen die funktionellen Systeme von mehrzelligen Organismen auf verschiedenste Weise. Besonders zwei dieser Arten von Zelltoden sollen nun hier wegen ihrer Relevanz für diese Arbeit genauer beleuchtet werden. Weiterhin sollen sie in den Kontext des Immunsystems eingeordnet werden. Bekannte Arten des Zelltodes können auf zwei verschiedene Weisen eingeteilt werden. Die eine Einteilung richtet sich nach der Energieabhängigkeit des Prozesses. Auf der einen Seite gibt es die regulierten und energieabhängigen Zelltode wie Apoptose, Pyroptose und Autophagie. Auf der anderen Seite, der energieunabhängige, unregulierte Prozess der Onkose/Nekrose (D'Arcy, 2019, Kroemer et al., 2009).

Eine weitere Einteilung kann nach primär nicht-inflammatorischen und proinflammatorischen Zelltoden erfolgen. Die Apoptose ist hierbei ein nicht-inflammatorischer Prozess, bei dem keine Zellbestandteile und Mediatoren in die Umgebung entlassen werden. So kommt es zu keiner Schädigung der

umliegenden Zellen. Onkose/Nekrose und Pyroptose sind dagegen pro-inflammatorische Prozesse. Hier kommt es durch die unkontrollierte Freisetzung von Zellbestandteilen (Onkose/Nekrose) bzw. durch die massive Sezernierung von inflammatorischen Zytokinen (Pyroptose) zu einer Schädigung von umliegenden Zellen sowie zur Anziehung von Immunzellen (Edinger and Thompson, 2004, Bergsbaken et al., 2009).

Die Apoptose wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet. Dieser seit 1972 bekannte Prozess bezeichnet einen stark regulierten und strukturierten Vorgang der Zelle ohne, dass Bestandteile aus dem Zellinneren in die Umgebung gelangen (Kerr et al., 1972). Sie nimmt eine wichtige Rolle in der ontogenetischen Entwicklung, Gewebshomöostase und in der Steuerung von adäquaten Immunantworten ein (Golstein, 1998, Vaux et al., 1994). Die Apoptose kann in einen intrinsischen und einen extrinsischen Pfad unterschieden werden. Schlüsselfunktionen nehmen dabei eine Gruppe von Cysteinproteasen ein, die Caspasen (engl.: cysteinyl-aspartate specific protease) genannt werden. Sie werden in Initiator- und Effektor-Caspasen eingeteilt (Elmore, 2007, Lavrik, 2005). Zuerst werden die Initiator-Caspasen aktiviert, welche wiederum die Effektor-Caspasen aktivieren.

Die zentrale Initiator-Caspase, Caspase 9, des intrinsischen Pfades kann über negative und positive Stimulation aktiviert werden. Die negative Stimulation erfolgt beim Ausbleiben bestimmter Überlebenssignale durch einen Mangel an Hormonen, Zytokinen oder Wachstumsfaktoren. Ohne diese Signale werden sonst inhibierte pro-apoptotische Proteine wie Puma, Noxa, Bax, Bak o.ä. aktiv. Positive Stimulation erfolgt, wenn die Zelle Einflüssen wie Hypoxie, Toxinen, Viren, radioaktiver Strahlung und anderen Noxen ausgesetzt ist. Durch diese negativen und positiven Stimuli gelangen pro-apoptotische Proteine wie Cytochrom C, Smac (engl.: second mitochondria-derived activator of caspases) und andere aus den Mitochondrien in das Zytoplasma (Kluck et al., 1997). Dies hat die Aktivierung von Caspase 9 durch das Apaf-1 Apoptosom zur Folge (Cain et al., 2002). Diese aktiviert als Protease die Effektor-Caspasen (3,6,7), welche eine apoptotische Kaskade induzieren. Diese Kaskade beinhaltet die Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen sowie Abbau von Zytoskelett

und Kernproteinen. Durch Abbau und Denaturierung der Proteine des Zytoskeletts schrumpft die apoptotische Zelle (Majno and Joris, 1995). Die Zelle schüttet nicht-inflammatorische aber chemotaktisch wirksame Botenstoffe aus, die „Find-me-signals“ (engl. für „Finde-mich-Signale“) genannt werden (Lauber et al., 2003). Ebenfalls werden Liganden für phagozytierende Zellen auf der Oberfläche exprimiert, sogenannte „Eat-me-signals“ (engl. für „Ess-mich-Signale“) (Fadok et al., 1992).

Der extrinsische Weg der Apoptose verläuft über sogenannte Todesrezeptoren (DR). Diese gehören häufig zur Familie der TNF-Rezeptoren. Ein Beispiel für einen DR wäre der Fas-Rezeptor (Cascino et al., 1995). Die DR werden durch Todesliganden von Natürlichen-Killer-Zellen, Makrophagen und Cytotoxischen-T-Zellen aktiviert (Nagata, 1997). Durch ihre Aktivierung wird ein Komplex aus dem „TNF-Rezeptor-assoziierten Protein“ (TRADD) und dem „Fas-assoziierte Protein mit Todesdomäne“ (FADD) gebildet. Durch diesen Komplex wird die Initiator-Caspase 8 aktiviert. Die aktive Caspase 8 initiiert nun über zwei Wege die Apoptose der Zelle. Zum einen aktiviert sie die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7, die die gleiche apoptotische Kaskade wie beim intrinsischen Pfad einleiten (Lavrik, 2005). Zum anderen generiert sie aus dem Protein BID (engl.: BH3-interacting domain death agonist) das geschnittene pro-apoptotische Protein tBID (engl.: truncated BID). Dieses inhibiert einerseits die anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie (engl.: B-cell lymphoma 2), der es als pro-apoptotisches Protein selbst angehört. Andererseits bewirkt es zusammen mit pro-apoptotischen Teilen der Proteinfamilie wie Bak (engl.: Bcl-2 homologous antagonist/killer) und Bax (engl.: Bcl-2-associated X protein) eine Freisetzung der oben genannten pro-apoptotischen Proteine Cytochrom C, Smac etc. aus den Mitochondrien (Kluck et al., 1997, Czabotar et al., 2014). Diese leiten dann die Apoptose über den mitochondrialen Pfad und Caspase 9 ein. Zellen, die in der Apoptose den direkten extrinsischen Pfad über die Effektor-Caspasen einschlagen, werden als Typ-I-Zellen bezeichnet. Zellen, in denen der mitochondriale Umweg erforderlich ist, werden den Typ-II-Zellen zugeordnet (Spencer et al., 2009).



Die Bcl-2-Familie ist eine Gruppe von Proteinen, die zu den wichtigsten Regulatoren der Apoptose zählen. Der Name der Gruppe stammt vom ersten entdeckten Protein dieser Art. Bcl-2 wurde in Zellen von B-Zell-Lymphomen entdeckt, die durch eine translokationsbedingte Überexpression dieses anti-apoptotischen Effektors resistent gegen intrinsische und extrinsische Apoptose-Induktion geworden sind (Tsujimoto et al., 1985, Vaux et al., 1988, McDonnell et al., 1989). Proteine der Bcl-2-Gruppe werden in anti- und pro-apoptotische Effektoren unterteilt. Die anti-apoptotische Gruppe umfasst Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> (engl.: B-cell-lymphoma-extra-large), Bcl-w (engl.: B-cell-lymphoma-w) und Mcl-1 (engl.: Myeloid-cell-leukemia-1). Zu den pro-apoptotischen Effektoren zählen Bax, Bak, Bad (engl.: Bcl-2-associated agonist of cell death), Bid, Bik (engl.: Bcl-2-interacting killer), Bim (engl.: Bcl-2-like protein 11), Noxa (lat. für Schaden) und Puma (engl.: p53 upregulated modulator of apoptosis). Pro- und anti-apoptotische Effektoren der Bcl-2-Familie stehen durch die gegenseitige Inhibition in Wechselwirkung miteinander. Das Gleichgewicht dieser beiden Gruppen ist maßgeblich für die Sensibilität einer Zelle gegenüber Apoptose-Stimuli (Czabotar et al., 2014).

Die Apoptose spielt eine zentrale Rolle in der DC-Homöostase und damit in der adäquaten Funktionalität des Immunsystems. DCs induzieren die Apoptose in autoreaktiven T-Lymphozyten (Ohnmacht et al., 2009). Ebenso ist jedoch auch die Apoptose der DCs als Schicksal nach ihrer Aktivierung festgelegt. Die Apoptose von DCs ist essenziell für die Abmilderungen von Immunreaktionen, die Unterbindung von Hypersensitivitätsreaktionen und die Verminderung des Risikos von Autoimmunität (Chen et al., 2006, Marx, 2006, Matsue and Takashima, 1999). Auf der anderen Seite phagozytieren DCs im steady state dauerhaft Teile apoptotischer Zellen in der Peripherie und präsentieren diese in den drainierenden Lymphknoten, wodurch sie maßgeblich zur peripheren Toleranz beitragen (Audiger et al., 2017).

Die Onkose bzw. Nekrose ist im Vergleich mit der Apoptose der unkontrollierte und vom Organismus ungewollte Zelltod. Dieser tritt unter pathologischen Gegebenheiten auf. Hierbei kommt es zu einer unkontrollierten Freisetzung von Produkten aus dem Zytosol und Nukleus der Zellen. Dies führt zu einem starken

inflammatorischen Reiz und einer Einwanderung von Immunzellen. Die Konsequenz ist eine inflammationsbedingte Schädigung des umliegenden Gewebes (Majno and Joris, 1995).

Heute wird die Onkose (altgriech. für „Schwellung“) als der eigentliche Prozess vor Eintritt des unkontrollierten Zelltodes angesehen. Die Nekrose wird dagegen als Konsequenz der Onkose und des unkontrollierten Zelltodes betrachtet (Jaeschke and Lemasters, 2003). Der Prozess der Onkose/Nekrose tritt nach einer ausgeprägten Schädigung der Zelle z.B. durch Hypoxie, Infektionen sowie physikalische oder chemische Noxen ein. Durch die Schädigung kann die Zelle ihre Funktionen und die Homöostase mit ihrem Umfeld nicht mehr aufrechterhalten. Es kommt zu einer Erschöpfung der zellulären Energiereserven. Die Zelle und ihre Organellen beginnen zu schwellen, dies beruht auf einem Ausfall der Ionenkanäle, der auf einen Mangel an ATP (Adenosintriphosphat) zurückzuführen ist (Majno and Joris, 1995). Die Permeabilität der Zellmembran nimmt zu und Zellbestandteile beginnen auszutreten. Die Zelle exprimiert pro-inflammatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche. Die Ruptur der Zellmembran, unkontrolliertes Austreten von Zellbestandteilen, inflammatorischer Reiz und kollaterale Schädigung des umliegenden Gewebes sind die Konsequenzen dieses Prozesses. Die Schädigung des umliegenden Gewebes erfolgt durch einwandernde aktivierte Immunzellen wie z.B. Makrophagen, aber auch durch proinflammatorische Zytokine (Festjens et al., 2006).

Seit 2005 wird eine spezielle Form der Nekrose diskutiert, die Nekroptose. Diese wird als eine regulierte Unterart der Nekrose angesehen, die Charakteristika der Autophagie zeigt. Sie wird durch Liganden der Todesrezeptoren aus der TNF-Familie initiiert und über RIP 1 und RIP 3 (engl.: receptor interacting protein 1 + 3) reguliert (Degterev et al., 2005, Cho et al., 2009, He et al., 2009).

Eine Zelle, die bereits den Pfad der Apoptose eingeschlagen hat, kann während des Prozesses noch sekundär nekrotisch werden. Dies hängt mit der für die Apoptose benötigten Energie zusammen. Reichen die intrazellulären Energiereserven nicht für den Abschluss der Apoptose aus, stirbt die Zelle durch sekundäre Onkose/Nekrose (Kerr et al., 1972).

Die Onkose/Nekrose hat unter physiologischen Bedingungen keinen besonderen Einfluss auf Homöostase und Funktion von DCs, jedoch löst die Nekrose von Zellen bzw. die damit verbundene Freisetzung ihrer Bestandteile eine Immunreaktion aus, an der auch DCs beteiligt sind. Kommt es im Verlauf dieser Immunreaktion zu Fehlern bei der Phagozytose oder bei der lysosomalen Verarbeitung von Zellbestandteilen, können diese im pro-inflammatorischen Setting zu Autoimmunerkrankungen führen. Dieser Vorgang wird unter anderem durch DCs vermittelt (Nagata et al., 2010).

Weitere Arten des Zelltodes, die hier nicht genauer besprochen werden, sind Pyroptose und Autophagie. Die Pyroptose ist eine regulierte Form des Zelltodes ähnlich der Apoptose. Jedoch unterscheiden sich beide Vorgänge in einem entscheidenden Detail. Im Gegensatz zur nicht-inflammatorischen Apoptose kommt es bei der Pyroptose zu einer massiven Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen (Bergsbaken et al., 2009). Diese Form des Zelltodes wird vor allem im Zuge von Infektionskrankheiten beobachtet (Man et al., 2017). Bei der Autophagie handelt es sich nicht zwangsweise um eine Art des Zelltodes. Es werden selektive, teilweise oder komplette Autophagie unterschieden. Autophagie bedeutet hierbei Selbstverdau einer Zelle oder einzelner ihrer Strukturen (Mizushima et al., 2008). Beispiele für eine selektive Art der Autophagie sind die Prozessierung und Präsentation von intrazellulären Antigenen über den MHC I oder per Kreuzpräsentation über den MHC II (Levine and Deretic, 2007). Weiterhin wird die Autophagie von ganzen Proteinen, einzelnen Organellen oder der ganzen Zellen beobachtet (Mizushima et al., 2008).

### 1.3 Der Formylpeptidrezeptor 2

Der murine Formylpeptidrezeptor 2 (Fpr2 oder mFPR2) gehört zur Familie der Formylpeptidrezeptoren (FPR). Er verfügt über sieben transmembranöse Domänen und ist G-Protein gekoppelt. Ursprünglich wurde die FPR-Familie als chemotaktische Rezeptoren auf Neutrophilen Granulozyten entdeckt. Als Liganden wurden vor allem bakteriell produzierte Oligopeptide mit N-Formylmethionin identifiziert. Die FPR-Familie besteht im humanen Organismus

aus drei (FPR1, FPR2, FPR3), im murinen Modell aus mindestens sieben Rezeptoren (Ye et al., 2009, Migeotte et al., 2006, Takano et al., 1997). Eindeutige Orthologe zwischen humanen und murinen FPR können nicht bestimmt werden, aber sie ähneln sich in Struktur, Funktionen und Liganden. Zum Beispiel zeigen die murinen mFpr2 und fpr-rs1 (Formylpeptidrezeptor 1) Sequenzähnlichkeiten mit dem humanen FPR2. Der mFpr2 gleicht sequenziell zu 76 % dem FPR2 und zu 63 % dem FPR3 (Ye et al., 2009, Hartt et al., 1999). Der mFpr2 teilt darüber hinaus Funktionen mit beiden Rezeptoren (Gao et al., 1999, Devosse et al., 2009). Der murine mFpr1 zeigt ebenfalls funktionelle Gemeinsamkeiten mit dem humanen FPR2 (He et al., 2013). Inzwischen sind neben den N-formylierten Peptiden noch weitere Liganden sowohl endogenen als auch exogenen Ursprungs identifiziert worden. Es konnte gezeigt werden, dass der mFpr2 nur über eine geringe Affinität zu N-formylierten Peptiden verfügt, im Gegenzug aber eine hohe Affinität zu endogenen Peptiden wie F2L aufweist (He et al., 2013, Gao et al., 2007). Weitere Liganden des mFpr2 sind zum Beispiel Annexin A1 (Perretti et al., 2002), Lipoxin A4 (Vaughn et al., 2002) und das Akute-Phase-Protein Serumamyloid A (SAA) (Su et al., 1999).

Verschiedene Rezeptoren der FPR-Familie werden auf vielen Zellen des Immunsystems exprimiert, z.B. auf Granulozyten, Makrophagen, DCs, T- und B-Lymphozyten (Migeotte et al., 2006). Im murinen Modell wird der mFPR2, neben neutrophilen Granulozyten, ebenfalls von DCs exprimiert (Schreiner et al., 2013). Neben der initial entdeckten chemotaktischen Funktion konnte eine Beteiligung der FPR an vielen verschiedenen Prozessen gezeigt werden, die unter anderem auf der Vielzahl der verschiedenen Liganden beruht (Migeotte et al., 2006).

Die FPR spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Immunreaktion (Gao et al., 1999, Liu et al., 2012). Trotzdem scheinen FPR ebenfalls relevant für die Vermeidung von Hypersensibilität und überschießenden inflammatorischen Reaktionen zu sein (Levy et al., 2002, Dufton et al., 2010, Giebeler et al., 2014). Diese gegensätzlichen Funktionen und die Promiskuität des FPR2 werden auf unterschiedliche Domänen und die damit einhergehende Interaktion mit verschiedenen Liganden des Rezeptors zurückgeführt (Le et al., 2005). So bewirken beispielsweise Lipoxin A4 und Annexin A1 anti-inflammatorische

Effekte (Chiang et al., 2006, Dufton et al., 2010, Machado et al., 2020). Annexin A1 kann in diesem Fall autokrin, parakrin oder juxtakrin an Zielzellen die Sekretion von IL-10 induzieren (Ferlazzo et al., 2003). Weiterhin induziert Annexin A1 über den FPR2 Apoptose in Neutrophilen Granulozyten (Solito et al., 2003) und deren nicht-inflammatorische Phagozytose durch Makrophagen (Scannell et al., 2007). Trotzdem scheint der humane FPR2 zusätzlich über eine anti-apoptotische Funktion zu verfügen, die auf eine besondere Recycling-Sequenz im C-Terminus des Rezeptors zurückzuführen ist (Thompson et al., 2014). Über andere Liganden wie SAA werden pro-inflammatorische Effekte initiiert (He et al., 2003).

#### 1.4 Ziel der Dissertation

Ziel dieser Dissertation ist es, den Einfluss des oben genannten FPR2 auf die Homöostase Dendritischer Zellen zu untersuchen. In Versuchen von Armbruster et al. (Armbruster et al., unveröffentlichte Ergebnisse) zeigten sich höhere Zahlen von Dendritischen Zellen in der Milz von FPR2<sup>-/-</sup> Mäusen als in der von Wildtyp Mäusen. Dies führt zu der Vermutung, dass der murine FPR2 die Homöostase der DCs beeinflussen könnte. Die Hypothese dieser Arbeit lautet also, dass der FPR2 die Homöostase von DCs beeinflusst. Dies könnte in einer veränderten Differenzierung von Vorläuferzellen, in einer veränderten Funktion und Migration von DCs oder in einem veränderten Apoptose-Verhalten der DCs begründet sein. DCs stellen als professionelle APCs eine Schaltzentrale zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar (Merad et al., 2013). Wie bereits oben beschrieben, ist die adäquate Menge Dendritischer Zellen in einem Organismus essenziell für die physiologische Funktionsweise seines Immunsystems. Eine Verschiebung dieses Gleichgewichts kann in der Entstehung von Erkrankungen, wie Infektionen, Malignomen, Autoimmunität oder Hypersensibilität, resultieren (Steinman, 1991, Stranges et al., 2007, Lambrecht et al., 1998, Merad and Manz, 2009). Ein tieferes Verständnis davon, welchen Einfluss der FPR2 auf die Dendritischen Zellen hat, könnte neue Erkenntnisse zur Entstehung dieser Erkrankungen und Ansätze für neue Therapieprinzipien liefern.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Wildtyp- und FPR2<sup>(-/-)</sup>-Mäuse

Als Wildtyp-Mäuse wurden weibliche C57BL/6-Mäuse von der Firma Janvier (St. Berthevin Cedex, Frankreich) verwendet. Die FPR2<sup>(-/-)</sup>-Mäuse wurden in der Tierhaltung der Universitätsklinik Tübingen gezüchtet (Chen et al., 2010, Holzenberger et al., 2000). Die Mäuse wurden unter besonderen keimfreien Bedingungen gehalten. Sie wurden bedarfsgerecht mit Wasser und Futter zur freien Verfügung versorgt. Die Mäuse wurden im Alter von 6 – 12 Wochen für Versuche eingesetzt. Alle Experimente wurden im Rahmen von Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Versuchstierkunde / Society of Laboratory Animal Science (GV-SOLAS) und der Federation of Laboratory Animal Science Association (FELASA) durchgeführt. Das Protokoll wurde vom Regierungspräsidium Tübingen überprüft und anerkannt (Anzeige 09.01.2014). Insgesamt wurden 68 Mäuse in den Versuchen eingesetzt, davon wurden 14 Mäuse während der Versuchsdurchführung ausgeschlossen. Der Ausschluss erfolgte wegen Kontamination von erstellten Zellkulturen oder wegen zu geringer Zellzahlen durch Fehler bei der Präparation.

### 2.2 Organentnahme und -aufbereitung

#### 2.2.1 Entnahme der Organe

Die Mäuse wurden durch eine geschulte Person mit CO<sub>2</sub> und Genickbruch getötet. Anschließend wurden die Mäuse auf eine, mit einer saugfähigen Unterlage bedeckten, Korkplatte gelegt und mit Kanülen unterhalb der vorderen Extremitäten sowie an den Pfoten der hinteren Extremitäten fixiert. Die Maus wurde großzügig mit Descosept (Dr.Schumacher) desinfiziert.

Mithilfe einer sterilen Schere und einer sterilen anatomischen Pinzette wurde die Bauchdecke eröffnet und die Milz aufgesucht, die sich aus Sicht des/der Präparateur\*In kranial, rechts in der Tiefe befand. Das Peritoneum über der Milz wurde vorsichtig eingeschnitten. Die Milz wurde, möglichst ohne Läsionen zu verursachen, mit der Pinzette entnommen und in einer Petrischale (Greiner Bio-One) auf Eis bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Im weiteren Verlauf wurden Fell und Haut über den Hinterbeinen eingeschnitten und die Muskulatur von Hüft- bis Sprunggelenk freigelegt. Die Femora wurde vorsichtig, ohne Einschneiden des Knochens, im Hüftgelenk vom Acetabulum getrennt. Die Tibiae wurden durch vorsichtiges Durchschneiden des Sprunggelenks von der Pfote getrennt. Die entnommenen Tibiae und Femora wurden nun in eine Petrischale mit 5 ml sterilem Phosphat buffered saline (engl. für phosphatgepufferte Salzlösung, PBS; Gibco) gegeben und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis aufbewahrt.

### 2.2.2 Aufbereitung der Milz

Es wurde ein Digestionsmedium für den Milzverdau vorbereitet, bestehend aus RPMI 1640-Medium (Merck) mit 2% fetalem Kälberserum (FCS, Sigma-Aldrich), dem 50 µl DNase I und 100 µl Kollagenase IV pro ml Medium zugegeben wurden. 100 µl dieses Mediums wurden in den Wells (engl. für Wanne) einer 12 well-Platte (Greiner Bio-One) vorgelegt. Im Anschluss wurde die Milz in das jeweilige Well übertragen und mit der Schere in möglichst kleine Stücke zerschnitten. Nun wurden weitere 2 ml des Digestionsmediums hinzugegeben und die 12 well-Platte wurde für 30 Minuten in einen 37°C warmen CO<sub>2</sub>-Incubator (Sanyo) zur Inkubation gebracht.

Nach 30 Minuten wurde die Reaktion mit 100 µl 100 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, Sigma-Aldrich) abgestoppt und die verdaute Suspension wurde durch ein 70 µm Sieb (Greiner Bio-One) in ein 50 ml Zentrifugationsgefäß (BD Falcon) übertragen. Größere Gewebestücke wurden mithilfe eines Spritzenstempels (Braun) durch das Sieb gepresst. Anschließend wurde jedes benutzte Well der Platte, Sieb und Spritzenkonus mit 3 ml PBS nachgespült, um den Zellverlust gering zu halten. Die 50 ml Zentrifugationsgefäße wurden mit 400xg bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Eppendorf) und der Überstand verworfen. Das verbleibende Zellpellet wurde in 15 ml Erylysepuffer (Nährbodenküche UKT) resuspendiert und zur Lyse der Erythrozyten für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit jeweils 15 ml PBS mit 2% FCS abgestoppt. Aus den 30 ml Suspension wurden 20 µl zur Zellzählung entnommen. Die Zellen wurden

mithilfe des Gerätes Countess (Invitrogen) gezählt. Zur Diskrimination zwischen lebenden und toten Zellen wurde Trypan Blau (Sigma-Aldrich) verwendet, welches im Verhältnis 1:1 zu der Zellsuspension hinzugefügt wurde. Die verbliebene Zellsuspension wurde mit 400xg bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde im Rücklauf resuspendiert und die Zellzahl auf das neue Volumen berechnet. Anschließend wurde die gewünschte Zellzahl für weitere Schritte entnommen.

### 2.2.3 Aufreinigung des Knochenmarks

Die auf Eis gelagerten Tibiae und Femora wurden im Bereich des Kniegelenkes mit einer Schere durchtrennt. Die Knochen wurden mit einem, mit Descosept getränkten, Zellstofftuch von allem anhaftenden Gewebe befreit und desinfiziert. Anschließend wurden die Knochen in eine frische Petrischale mit sterilem 5 ml sterilem PBS überführt.

Die Markhöhle wurde mit einer Schere an beiden Enden eröffnet, das Knochenmark wurde mit PBS in ein 50 ml Zentrifugationsgefäß (BD Falcon) ausgespült. Um den Zellverlust gering zu halten, wurde hierfür das PBS aus der Petrischale verwendet. Der Spülvorgang wurde mit einer 10 ml Spritze (Braun) und einer Kanüle (Braun) durchgeführt. Eine erfolgreiche Spülung konnte an der zunehmenden Entfärbung des zuerst rötlichen Knochens ins Weiße erkannt werden.

Die 50 ml Zentrifugationsgefäße wurden mit 400xg bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Zellpellet wurde in 5 ml Erylyse Puffer resuspendiert und zur Lyse der Erythrozyten für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml PBS mit 2% FCS abgestoppt. Die 10 ml Suspension wurde durch ein 70 µm Sieb in ein neues 50 ml Zentrifugationsgefäß überführt. Aus den 10 ml Suspension wurden 10 µl zur Zellzählung am Mikroskop entnommen. Diese wurden in ein Well einer 96 well-Platte (Rundboden, Sarstedt) übertragen und jeweils mit 90 µl Trypan Blau (Sigma-Aldrich) gemischt. Ein Tropfen des Gemischs wurde auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Die lebenden Zellen wurden gezählt und die Zellzahl für die Gesamtsuspension



errechnet. Die restliche Suspension wurde mit 400xg bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde im Rücklauf resuspendiert. Die Zellkonzentration wurde auf das neue Volumen berechnet. Anschließend wurde die gewünschte Zellzahl für weitere Schritte eingesetzt.

## 2.3 Zellkulturen aus Knochenmarkszellen

### 2.3.1 Ansetzen von Zellkulturen mit GM-CSF

Nach der Zellzählung unter dem Mikroskop wurden die Zellen in warmem (37°C) Nährmedium aufgenommen, um eine Zellkonzentration von  $2 \times 10^6$ /ml zu erreichen. Das verwendete Medium bestand aus RPMI 1640 (Merck) mit 10 % FCS, 1 mM Natrium-Pyruvat (Biochrom), 2 mM L-Glutamin (Gibco), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco), 1X nicht-essenzielle Aminosäuren (Biochrom) und 50  $\mu$ M Mercaptoethanol (Gibco). Weiterhin wurde der Zellsuspension Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulationsfaktor (GM-CSF, eigene Herstellung) in einer Konzentration von 20 ng/ml zugegeben.

Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde nun in eine Petrischale ausgesät und diese mit weiteren 10 ml des mit GM-CSF versetzten Nährmediums aufgefüllt.

Es wurden von beiden Mauslinien mindestens 10 Petrischalen für weitere Versuchsschritte ausgesät. Die Petrischalen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 7 Tage inkubiert (CO<sub>2</sub>-Inkubator, Sanyo). Am dritten Tag erfolgte eine Medium Zugabe von 10 ml erwärmtem Nährmedium mit GM-CSF pro Petrischale. Am Tag sechs erfolgte ein Medium Wechsel. Hierzu wurden aus jeder Petrischale 10 ml Medium entnommen und in 50 ml Zentrifugationsgefäße gefüllt, diese wurden mit 400xg bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die Zellpellets wurden in 10 ml frischem Medium mit GM-CSF pro Schale resuspendiert und zurück in die Petrischalen gegeben.

### 2.3.2 Ernten der BMDCs

Nach sieben Tagen Inkubation im Zellkulturmedium mit GM-CSF waren die BMDCs genug gereift, um sie für weitere Schritte zu verwenden. Dies zeigte sich

durch die Expression von MHC II und CD11c. Der korrekte Zeitpunkt wurde im Vorversuch per Durchflusszytometrie analysiert.

Zur Ernte der BMDCs wurde die Zellkulturschalen aus dem Wärmeschrank entnommen und unter die Sterilbank gestellt. Ebenfalls wurden 50 ml Falcons (BD Falcon) unter die Sterilbank gestellt. Für fünf Platten mit einem Volumen von je 20 ml wurden zwei 50 ml Falcons bereitgestellt. Die Falcons für C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs wurden beschriftet, um versehentliche Vermischung zu verhindern. Zuerst wurden 10 ml einer Schale mithilfe der Pipettierhilfe (Accu-Jet, Brand) abgesaugt und in ein Falcon überführt. Die restlichen 10 ml wurden verwendet, um die Schale mehrfach sorgfältig zu spülen, bevor sie ebenfalls in den Falcon überführt wurden. Nachdem alle Petrischalen nach diesem Procedere in Falcons übertragen worden waren, wurden sie für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 400xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden in 10 ml 37°C warmem Medium resuspendiert. Nach guter Durchmischung der Zellsuspension mit der Pipettierhilfe wurden pro Falcon 10 µl entnommen und mit 90 µl Trypan-Blau vermischt. Aus dieser Mischung wurden ca. 7 µl auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Die Zellen wurden dann unter dem Mikroskop gezählt und die Zellzahl auf das gesamte Falcon aufgerechnet. Anschließend wurde das Volumen der Zellen in der Suspension auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

### 2.3.3 Aussäen und Stimulation der BMDCs mit LPS

Da die Zellen zur Stimulation und zur Analyse in einer vorbestimmten Konzentration (hier  $1 \times 10^6$  Zellen/ml) vorliegen mussten und außerdem technische Replikate erzeugt werden sollten, wurden die Zellen nun in kleinere Versuchsgefäße als Petrischalen ausgesät. Im Falle der späteren Durchflusszytometrie handelte es sich hier um eine unbeschichtete 24 well-Flachbodenplatte (Greiner Bio-One), die Zellen für die Analyse der Zytokinproduktion wurden in einer unbeschichteten 96 well-Flachbodenplatte (Greiner Bio-One) ausgesät und stimuliert.

Zur Verwendung für die spätere durchflusszytometrische Analyse der stimulierten und nicht stimulierten BMDCs wurden diese in eine unbeschichtete

24 well-Platte (Greiner Bio-One) überführt. Hierbei wurden pro Well 500 µl mit  $5 \times 10^5$  Zellen ausgesät. Dies entsprach der vorher eingestellten Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml. Sowohl für die stimulierten als auch nicht stimulierten BMDCs beider Mauslinien wurden drei technische Replikate pro Maus erstellt. Zur Stimulation der BMDCs sollte in den vorgesehenen Wells eine LPS-Konzentration von 100 ng/ml erreicht werden. Hierfür wurden aufgetaute LPS-Aliquots mit einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Um die vorgesehene Konzentration von 2 µg/ml in den Wells zu erreichen, musste die LPS-Lösung aus dem Aliquot insgesamt um einen Faktor von 10.000 verdünnt werden. In einer Vorverdünnung um den Faktor 200 wurden 5 µl der LPS-Lösung zu 995 µl Zellkulturmedium pipettiert und sorgfältig gemischt. Anschließend wurden je 10 µl dieser Vorverdünnung pro vorgesehenem Well mit zu stimulierenden BMDCs pipettiert. Die Platten wurden nun in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt, der Zeitpunkt notiert und die 24 well-Platten für 6 bzw. 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Um später die sezernierten Konzentrationen von Zytokinen per ELISA bestimmen zu können, wurden BMDCs von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen in die vorgesehenen Wells einer unbeschichteten 96 well-Flachboden-Platte (Greiner Bio-One) übertragen. Pro Well wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 250 µl Medium (ohne GM-CSF) ausgesät. Dies entsprach einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml. Zur Stimulation mit LPS wurde ein aufgetautes Aliquot mit einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet.

In den zur Stimulation vorgesehenen Wells sollte eine LPS-Konzentration von 100 ng/ml erreicht werden. Hierfür musste die LPS-Lösung aus dem Aliquot um den Faktor 10.000 verdünnt werden. Zuerst wurde eine Vorverdünnung um den Faktor 400 vorgenommen. 2,5 µl wurden aus dem LPS-Aliquot entnommen und zu 997,5 µl DC-Medium hinzu pipettiert und gut gemischt. Von dieser Vorverdünnung wurden dann 10 µl in die entsprechenden Wells der Platte pipettiert. So wurde in 250 µl Medium eine Konzentration von 100 ng/ml erreicht. Die Platte wurde anschließend für 24 Stunden im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 h wurden die Überstände mithilfe einer 8-Kanal-Pipette

in eine unbeschichtete Rundbodenplatte überführt. Diese wurde bei -20°C bis zur weiteren Analyse per ELISA gelagert.

## 2.4 Färbung der Zellen für die Analyse im Durchflusszytometer

### 2.4.1 Fluorescence Minus One-Kontrollen

Zur korrekten Interpretation der Durchflusszytometrie-Daten, zur genauen Gate-Setzung in Flowjo® und zur Bestimmung des negativ/positiv Cut-off von Fluorochromen wurden von einigen Farben im Multicolorpanel Fluorescence Minus One-Kontrollen (engl. für Fluoreszenz minus eins- Kontrollen; FMO) hergestellt. Hierfür wurden im Versuch nicht benötigte Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit allen Antikörpern, bis auf den kontrollierten Antikörper, gefärbt.

### 2.4.2 Kompensationskontrollen

Zur Vermeidung von Analysefehlern und falsch-positiven Ergebnissen durch Streuung der Fluorochrome in benachbarte Kanäle des Multicolorpanel wurden Kompensationskontrollen angefertigt. Für diese Kontrolle wurden, pro kontrolliertem Antikörper, jeweils 100 µl FACS-Puffer (engl.: fluorescence-activated cell sorting) und ein Tropfen (ca. 60 µl) Compbeads (BD; kleinste Silikonpartikel mit Bindungstellen zur unspezifischen Bindung mit Antikörpern) in ein Teströhrchen gegeben. Einzig für die Lebend/Tot-Färbung mit Zombie NIR oder Aqua wurden getötete Zellen verwendet. Im Anschluss wurde dann eine festgelegte Menge eines Antikörpers in die Teströhrchen pipettiert. Zu Beginn der Messung im Durchflusszytometer wurden nun die angefertigten Kompensationskontrollen mit dem Durchflusszytometer gemessen und anhand der ermittelten Werte wurde die Sensibilität der einzelnen Kanäle eingestellt.

### 2.4.3 Extrazelluläre Färbung der Vorläuferzellen im Knochenmark

Es wurden jeweils  $3 \times 10^6$  Zellen in ein Teströhrchen (BD Falcon) übertragen. Weiterhin wurden zur Erstellung von FMO- und ungefärbten Kontrollen jeweils  $1 \times 10^6$  von den nicht benötigten Zellen in je ein Teströhrchen übertragen. Alle Teströhrchen wurden bzgl. ihres Inhaltes beschriftet.

Zur Diskrimination zwischen toten und vitalen Zellen wurde eine Färbung mit dem Fluorochrom Zombie NIR (Biolegend) durchgeführt. Dieser bindet nicht permanent an lebende, aber permanent an Membranbestandteile nekrotischer Zellen. Zur Färbung wurde Zombie NIR im Verhältnis 1:100 verdünnt. In jedes Teströhrchen, ausgenommen der ungefärbten Zellen, wurden 50 µl des Gemischs pipettiert. Im Anschluss wurden diese für 20 Minuten bei Raumluft inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde den Teströhrchen jeweils 1 ml FACS-Puffer zugegeben, die Teströhrchen wurden mit 400xg und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Um im weiteren Färbeprozess unspezifische Bindungen der Antikörper am Fc-Rezeptor (engl.: fragment crystallisable) der DCs und ihrer Vorläufer zu verhindern, wurde dieser mithilfe eines CD16/32 Antikörpers (Biolegend) blockiert. Hierzu wurden 10 µl Hybridom-Überstand mit CD16/32 Antikörpern in jedes Teströhrchen pipettiert. Diese wurden im Anschluss für 15 Minuten bei 4°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die extrazellulären Oberflächenantigene mit den Antikörpern 2,5 µl CD3 FITC (pur; Miltenyi Biotec, REA641), 2,5 µl CD19 FITC (pur; Miltenyi Biotec, 6D5), 2,5 µl Ter119 FITC (pur; Miltenyi Biotec, Ter-119), 5 µl NK1.1 FITC (1:20; eBioscience, PK136), 5 µl Ly6G FITC (1:40; Biolegend, 1A8), 5 µl B220 BV650 (1:5; Biolegend, RA3-6B2), 5 µl MHC II PerCP (1:20; Biolegend, M5/114.15.2), 5 µl CD11c PE-Dazzle (1:8; Biolegend, N418), 5 µl Ly6C PE-Cy7 (1:100; Biolegend, HK1.4), 5 µl CD11b AlexaFlour 700 (1:10; Biolegend, M1/70), 2,5 µl CD135 PE (1:2; Miltenyi Biotec, REA779), 5 µl CD172a APC (1:10; BD, P84), 5 µl Sca-1 Horizon V500 (1:20; BD, D7), 5 µl CD115 BV605 (1:5; Biolegend, AFS98), 5 µl CD117 BV421 (1:10; Biolegend, 2B8) pro Teströhrchen gefärbt. Die FMOs für CD135 PE, CD172a APC, Sca-1 Horizon V500, CD115 BV605 und CD117 BV421 wurden getrennt gefärbt. Im Anschluss wurden die Teströhrchen bei 4°C für 20 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde den Teströhrchen 1 ml FACS-Puffer hinzugegeben und sie wurden bei 400xg und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und das am Boden entstandene Zellpellet wurde im Rücklauf resuspendiert.

#### 2.4.4 Extrazelluläre Färbung der DCs aus der Milz

Von allen Mäusen wurden jeweils  $3 \times 10^6$  Zellen, die aus den Splenes isoliert wurden, in ein Teströhrchen übertragen. Weiterhin wurden zur Erstellung von FMO- und ungefärbten Kontrollen jeweils  $1 \times 10^6$  von den nicht benötigten Zellen in je ein Teströhrchen übertragen. Alle Teströhrchen wurden bzgl. ihres Inhaltes beschriftet.

Zur Färbung von abgestorbenen Zellen wurde in diesem Fall Zombie Aqua (Biolegend) verwendet. Dieser funktioniert nach den gleichen Prinzipien wie Zombie NIR im Knochenmark, ist jedoch mit einem anderen Fluorochrom zur besseren Integration in das verwendete Multicolorpanel beladen. Zur Färbung wurde Zombie Aqua im Verhältnis 1:200 verdünnt. In jedes Teströhrchen, ausgenommen der ungefärbten Zellen, wurden 50  $\mu$ l des Gemischs pipettiert. Im Anschluss wurden diese für 20 Minuten bei Raumluft inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde den Teströhrchen jeweils 1 ml FACS-Puffer zugegeben, die Teströhrchen wurden mit 400xg und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen.

Im Weiteren wurden 10  $\mu$ l des Fc-Blocks (CD16/32 Antikörper) in jedes Teströhrchen pipettiert. Diese wurden im Anschluss für 15 Minuten bei 4°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die extrazellulären Oberflächenantigene mit den Antikörpern 5  $\mu$ l CD8 FITC (1:10; Biolegend, 53-6.7), 5  $\mu$ l MHC II PerCP (1:20; Biolegend, M5/114.15.2), 5  $\mu$ l Ly6C PE-Cy7 (1:100; Biolegend, HK1.4), 5  $\mu$ l CD11c PE-Dazzle (1:8; Biolegend, N418), 5  $\mu$ l CD11b APC-Cy7 (1:20; BD, M1/70), 5  $\mu$ l CD4 eFluor450 (1:5; eBioscience, GK1.5), 5  $\mu$ l B220 BV650 (1:5; Biolegend, RA3-6B2) pro Teströhrchen gefärbt. Danach wurden die Teströhrchen für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach der der Inkubationszeit wurde 1 ml FACS Puffer hinzugefügt und die Teströhrchen wurden für 5 Minuten bei 400xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das am Boden des Teströhrchen gebildete Zellpellet wurde im Rücklauf aufgenommen.

#### 2.4.5 Apoptose-Assay mit Annexin V und 7AAD von Milz-DCs

Zur Analyse des Apoptoseverhaltens der DCs in der Milz wurde ein Apoptose-Assay durchgeführt. Hierfür wurde der Farbstoff Annexin V zur Markierung von apoptotischen Zellen benutzt, der Farbstoff 7AAD zur Markierung von nekrotischen Zellen. Pro Teströhrchen wurden  $3 \times 10^6$  aus den Splenes isolierte Zellen eingesetzt. Für die FMO- und ungefärbten Kontrollen wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen der zur Färbung eingesetzten Antikörper wurden jeweils 10  $\mu$ l Fc-Block (CD16/32 Antikörper) pro Teströhrchen pipettiert. Die Teströhrchen wurden zur Inkubation für 15 Minuten bei 4°C in den Kühlschrank gestellt. Nach der Inkubation wurden die extrazellulären Oberflächenantigene mit den Antikörpern 5  $\mu$ l MHC II eFlour450 (1:30; eBioscience, M5/114.15.2), 5  $\mu$ l Ly6C PE-Cy7 (1:100; Biolegend, HK1.4), 5  $\mu$ l CD11c PE-Dazzle (1:8; Biolegend, N418), 5  $\mu$ l CD11b APC-Cy7 (1:20; BD, M1/70), 5  $\mu$ l CD4 PE (1:20; eBioscience, RM4-4), 5  $\mu$ l CD8 BV785 (1:3; Biolegend, 53-6.7) pro Teströhrchen gefärbt. Im Anschluss wurden alle Teströhrchen für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Dann wurde den Teströhrchen 1 ml FACS-Puffer zugegeben und sie wurden für 5 min bei 400xg und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und der gleiche Waschvorgang wurde mit 4°C PBS wiederholt. Anschließend wurde den Teströhrchen 1 ml Binding-Puffer (Biolegend) hinzugegeben und sie wurden für 5 Minuten bei 4°C und 400xg zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und den Teströhrchen (ausgenommen die ungefärbten und FMO-Kontrollen) wurden jeweils 25  $\mu$ l Annexin V und 7AAD in einer Vorverdünnung von 1:50 zugegeben. Die Teströhrchen wurden kurz mit dem Vortex gemischt und dann für 15 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100  $\mu$ l Binding-Puffer hinzugefügt. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von 7AAD musste die Messung am Durchflusszytometer innerhalb von einer Stunde erfolgen.

#### 2.4.6 Intrazelluläre Färbung von Bcl-2

Zum Vergleich der Konzentration des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 wurde eine intrazelluläre Färbung dieses Proteins mithilfe von Antikörpern durchgeführt.

Pro Teströhrchen wurden  $3 \times 10^6$  aus den Splenes isolierte Zellen eingesetzt. Für die Bcl-2 FMO- und ungefärbte Kontrolle wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen der zur Färbung eingesetzten Antikörper wurden jeweils 10  $\mu$ l Fc-Block (CD16/32 Antikörper) pro Teströhrchen pipettiert. Die Teströhrchen wurden zur Inkubation für 15 Minuten bei 4°C in den Kühlschrank gestellt. Nach der Inkubation wurden die extrazellulären Oberflächenantigene mit den Antikörpern 5  $\mu$ l MHC II eFlour450 (1:30; eBioscience, M5/114.15.2), 5  $\mu$ l Ly6C PE-Cy7 (1:100; Biolegend, HK1.4), 5  $\mu$ l CD11c PE-Dazzle (1:8; Biolegend, N418), 2,5  $\mu$ l CD11b FITC (pur; Miltenyi Biotec, M1/70.15.11.5), 5  $\mu$ l CD172a APC (1:10; BD, P84), 2,5  $\mu$ l XCR1 BV510 (pur; Biolegend, ZET) und 0,5  $\mu$ l Zombie NIR (Biolegend) pro Teströhrchen gefärbt. Im Anschluss wurden alle Teströhrchen für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Dann wurde den Teströhrchen 1 ml FACS-Puffer zugegeben und sie wurden für 5 min bei 400xg und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Die Zellpellets am Boden der Teströhrchen wurden mithilfe des Vortexmischers resuspendiert. Um die extrazelluläre Färbung zu fixieren, wurde in jedes Teströhrchen jeweils 0,5 ml Fixation working solution (engl.: Fixierungs Arbeitslösung) (Biolegend) pipettiert und diese wurden für mindestens 60 Minuten bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden alle Teströhrchen für 5 Minuten bei 400xg und 4°C zentrifugiert und die Überstände wurden verworfen. In die Teströhrchen wurde nun jeweils 1 ml FOXP3 Fix/Perm Puffer (Biolegend) pipettiert, um die Zellmembran für die Antikörper zur intrazellulären Färbung permeabel zu machen. Die Ansätze in den Teströhrchen wurden direkt im Anschluss für 5 Minuten bei 400xg und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Den Teströhrchen wurden nun 5  $\mu$ l Fc-Block (CD 16/32 Antikörper) hinzugegeben und sie wurden für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden jedem Teströhrchen (ausgenommen der Bcl-2 FMO- und ungefärbten Kontrolle) 5  $\mu$ l Bcl-2 Antikörper-Lösung (1:4; Biolegend, BCL/10C4) zugegeben. Die Teströhrchen wurden im Anschluss für 30 Minuten bei 4°C und Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde in die Teströhrchen 1 ml FOXP3 Fix/Perm Puffer pipettiert und diese wurden bei 4 °C und 400xg für 5



Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Proben am Durchflusszytometer analysiert.

#### 2.4.7 Extrazelluläre Färbung der mit LPS stimulierten BMDCS

Die 24 well-Platte wurde nach 6 bzw. 24 h der Stimulation aus dem CO<sub>2</sub>-Inkubator entnommen. 500 µl des Mediumüberstandes wurden direkt in die beschrifteten FACS-Teströhrchen (BD Falcon) überführt. Alle Wells wurden nochmal mit 500 µl PBS (Gibco) in Raumtemperatur nachgespült und die Spülflüssigkeit wurde ebenfalls in das jeweilige FACS-Teströhrchen überführt. Nun wurde pro Well 200 µl Accutase (Innovative Cell Technologies, Inc.) hinzugegeben, um die stimulierten Zellen vom Grund des Wells zu lösen. Im Anschluss wurde die Platte für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden erneut 100 µl PBS in die Wells pipettiert. Durch sorgfältiges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vorsichtig von der Oberfläche gelöst und in die FACS-Teströhrchen überführt. Anschließend wurden die Teströhrchen für 5 Minuten bei 400xg und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen.

Im Weiteren wurden pro Teströhrchen 10 µl Fc-Block hinzugegeben und die Ansätze für 15 Minuten bei 4°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die extrazellulären Oberflächenantigene mit den Antikörpern 0,4 µl CD11c APC (pur; Miltenyi Biotec, N418), 0,8 µl MHC II eFluor450 (1:30; eBioscience, M5/114.15.2), 0,8 µl CD11b APC-Cy7 (1:20; BD, M1/70), 0,8 µl CD40 PerCP/Cy5.5 (1:3; Biolegend, 3/23), 0,8 µl CD80 PE (1:20; BD, 16-10A1), 0,8 µl CD54 FITC (1:10; 3E2), 0,8 µl CD86 BV605 (1:3; Biolegend, GL-1), 0,084 µl Zombie Aqua (Biolegend) pro Teströhrchen gefärbt. Danach wurden die Teströhrchen für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde 1 ml FACS Puffer hinzugefügt und die Teströhrchen wurden für 5 Minuten bei 400xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das am Boden des Teströhrchen gebildete Zellpellet wurde im Rücklauf aufgenommen.

Anschließend konnten die Zellen im Durchflusszytometer analysiert werden.

## 2.5 ELISA der durch die BMDCs sezernierten Zytokine

### 2.5.1 TNF ELISA

Für den TNF ELISA-Assay wurden die Überstände von 24 h mit LPS stimulierten und nicht stimulierten C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs verwendet. Der TNF ELISA-Assay wurde mit dem „Ready-Set-Go!“-ELISA-Set (eBioscience) durchgeführt.

Am ersten Tag wurden die 96 well-Platte (Nunc MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific) mit den Capture-Antikörpern (eBioscience, capture engl. für erfassen/einfangen) beschichtet. Diese dienten der verbesserten Bindung von TNF Molekülen auf der Oberfläche des Wells der Platte. Hierzu wurde der im Set enthaltene 10-fach Coating-Puffer (eBioscience, coating engl. für: Überzug/Schicht) mit sterilfiltriertem Wasser verdünnt. Das Verdünnungsverhältnis betrug hierbei 10:1 (H<sub>2</sub>O: Puffer). Die Capture-Antikörper wurden mit dem verdünnten Coating-Puffer im Verhältnis 250:1 (Puffer:Antikörper) verdünnt und gut vermischt. Anschließend wurden je 100 µl des Puffer-Antikörper-Gemischs in jedes Well der 96 well-Platte pipettiert. Die 96 well-Platte wurde mit einem Deckel verschlossen und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die 96 well-Platte aus dem Kühlschrank genommen und im ELISA-Washer (Hydroflex, Tecan) 3x gewaschen. Hierzu wurde ein Waschpuffer bestehend aus PBS (Gibco) und 0,05% Tween-20 (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Zur Blockierung der verbliebenen freien Stellen, auf der Oberfläche der Platte, wurde nun eine Blockierungslösung angesetzt. Diese Lösung bestand aus 5x Assay-Diluent und mit Mikrofilter filtriertem Wasser. Die Herstellung dieser Lösung fand unter der Sterilbank (Herasafe, Thermo Fisher Scientific) statt, da der 5x Assay-Diluent zum Teil aus FCS besteht, welches ein guter Nährboden für Bakterien ist. Die Blockierungslösung wurde im Verhältnis 1:5 (Assay-Diluent: H<sub>2</sub>O) gemischt. Die Platte wurde nach Beendigung des Waschvorgangs aus dem Gerät entnommen und je Well wurden 250 µl der Blockierungslösung pipettiert. Die 96 well-Platte wurde nun für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurde der Standard (eBioscience) aus dem -80°C-Schrank entnommen und auf Eis aufgetaut. Es wurden acht Eppendorf-Cups

vorbereitet, in sieben dieser Eppendorf-Cups wurden 500 µl der Blockierungslösung pipettiert und in einen Cup 900 µl. Der aufgetaute Standard wurde nun in zwei Schritten mit der Blockierungslösung insgesamt um den Faktor 1.000 verdünnt. Im ersten Schritt wurde eine Vorverdünnung um den Faktor 100 durchgeführt, hierfür wurden 5 µl TNF Standard zu 495 µl Blockierungslösung pipettiert und sorgfältig mit dem Vortex vermischt. Im zweiten Schritt wurde die Vorverdünnung um den Faktor 100 weiterverdünnt. Hierzu wurden 100 µl der Vorverdünnung entnommen und mit 900 µl der Blockierungslösung gemischt. Diese Verdünnung entsprach nun der höchsten TNF-Konzentration von 1.000 pg/ml, die als Kontrolle für das ELISA-Assay diente. Zur Erstellung der weiteren Kontroll-Konzentrationen für die Messung wurden der höchsten Konzentration 500 µl entnommen und mit 500 µl Blockierungslösung gemischt und so im Verhältnis 1:1 verdünnt. Dieser Schritt wurde 8x wiederholt, bis im letzten Eppendorf-Cup eine Konzentration von 15,6 pg/ml erreicht wurde.

Als nächstes wurden die Proben aufgetragen. Alle Proben aus den Überständen der 24 h mit LPS stimulierten BMDCs wurden vor dem Auftragen auf die vorbereitete Platte um den Faktor 20 verdünnt. Hierfür wurde eine unbeschichtete 96 well-Spitzbodenplatte (Greiner Bio-One) verwendet. In jeweils ein Well der Platte wurden 114 µl der Blockierungslösung pipettiert. Dann wurden 6 µl der jeweiligen Probe aus der aufgetauten Rundbodenplatte entnommen und den entsprechenden Wells hinzugefügt. Mithilfe von ausgiebigem Auf- und Abpipettieren wurden die Proben gut mit der Blockierungslösung vermischt. Die für 1 h mit Blockierungslösung inkubierte ELISA-Platte wurde nun erneut mit dem ELISA-Washer 3x gewaschen. Anschließend wurden alle Proben, stimuliert und nicht stimuliert, nach vorher erstelltem Plan pipettiert. Hierfür wurden jeweils 100 µl einer Probe in das vorgesehene Well pipettiert. In die ersten beiden Reihen der Platte wurden 100 µl der verschiedenen Verdünnungsstufen des Standards und in die unterste Zeile 100 µl Blockierungslösung als 0 pg/ml Standard pipettiert. Die Platte wurde verschlossen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nachdem die 2 Stunden vergangen waren, wurde die Platte wiederum 3x mit dem ELISA-Waschgerät gewaschen. Die Detection-Antikörper (eBioscience;

detection engl. für Erkennung) wurden im Verhältnis 1:250 (Antikörper:Blockierungslösung) mit Blockierungslösung verdünnt. Von den verdünnten Detection-Antikörpern wurden je 100 µl pro Well pipettiert, die Platte wurde anschließend für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss an die erneute Inkubation wurde die Platte wieder 3x mit dem Hydroflex gewaschen. Die Avidin-HRP (eBioscience; Avidin-Horseradish-Peroxidase engl. für Meerrettichperoxidase) wurde im Verhältnis 1:250 mit Blockierungslösung verdünnt (HRP:Blockierungslösung). Nach dem Waschen wurde nun jeweils 100 µl der verdünnten HRP pro Well pipettiert und die Platte für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde die Platte 6x im Hydroflex gewaschen. Dann wurden in jedes Well 100 µl der Substrat-Lösung (eBioscience) pipettiert und die Platte in Dunkelheit und bei Raumtemperatur für 3-5 Minuten inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 50 µl der Stopp-Lösung (eBioscience) in jedes Well pipettiert und im Zuge dessen wurde ein Farbumschlag zu gelb beobachtet. Die Platte wurde im ELISA-Reader (Tecan Sunrise) bei 450 nm<sup>4</sup> ausgelesen. Zur Überprüfung der korrekten Verdünnungsstufen des Standards wurden diese in einem Diagramm aufgetragen. Der entstandene Graph sollte einen linearen Anstieg zeigen. Verdünnungsstufen, die zu sehr von der linearen Kurve abwichen, wurden ausgeschlossen, bei zu vielen Abweichungen von Verdünnungsstufen musste der Standard erneut verdünnt, vorbereitet und separat eingelesen werden.

### 2.5.2 IL-10 ELISA

Für das IL-10 ELISA-Assay wurden die Überstände von 24 h mit LPS stimulierten und nicht stimulierten C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs verwendet.

Am ersten Tag wurden die 96 well-Platte (Nunc MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific) mit den Anti-Maus IL-10 Capture-Antikörpern (BD) beschichtet. Als Coating-Puffer wurde 0,1 M Natriumphosphat mit einem pH von 6.0 verwendet. Die Capture-Antikörper wurden mit dem verdünnten Coating-Puffer im Verhältnis 500:1 (Puffer:Antikörper) verdünnt und gut vermischt. Anschließend wurden je 100 µl des Puffer-Antikörper-Gemischs in jedes Well der 96 well-Platte pipettiert.

Die 96 well-Platte wurde mit einem Deckel verschlossen und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Platte aus dem Kühlschrank entnommen und im ELISA-Washer (Hydroflex, Tecan) 3x gewaschen. Hierzu wurde ein Waschpuffer bestehend aus PBS (Gibco) und 0,05% Tween-20 (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Zur Blockierung der verbleibenden freien Stellen auf der Oberfläche der Platte wurde eine Lösung aus PBS (Gibco) mit 10% FCS (Sigma-Aldrich) unter der Sterilbank angesetzt. Von dieser Blockierungslösung wurden 250 µl in jedes Well der ELISA-Platte pipettiert, diese wurde im Anschluss für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurde der IL-10 Standard (BD) aus dem -80°C-Schrank entnommen und auf Eis aufgetaut. Es wurden neun Eppendorf-Cups vorbereitet, in sieben dieser Eppendorf-Cups wurden 500 µl der Blockierungslösung pipettiert und zwei Cups 990 µl. Der aufgetaute Standard wurde nun in drei Schritten mit der Blockierungslösung insgesamt um den Faktor 100.000 verdünnt. Im ersten Schritt wurde eine Vorverdünnung um den Faktor 10 durchgeführt, hierfür wurden 5 µl IL-10 Standard zu 45 µl Blockierungslösung pipettiert sorgfältig mit dem Vortex vermischt. Im zweiten Schritt wurde die Vorverdünnung um den Faktor 100 weiterverdünnt. Hierzu wurden 10 µl der Vorverdünnung entnommen und mit 990 µl der Blockierungslösung gemischt. Im dritten Schritt wurde der zweite Schritt noch einmal wiederholt. Diese Verdünnung entsprach nun der höchsten IL-10 Konzentration von 1.000 pg/ml, die als Kontrolle für das ELISA-Assay diente. Zur Erstellung der weiteren Kontrollkonzentrationen für die Messung wurde der höchsten Konzentration 500 µl entnommen und mit 500 µl Blockierungslösung gemischt und so im Verhältnis 1:1 verdünnt. Dieser Schritt wurde 8x wiederholt bis im letzten Eppendorf-Cup eine IL-10 Konzentration von 15,6 pg/ml erreicht wurde.

Nach der einstündigen Inkubation wurde die Blockierungslösung mithilfe des ELISA-Washers aus den Wells der ELISA-Platte abgesaugt. Nun wurden jeweils 100 µl der Proben und verschiedenen Standard-Verdünnungen in die vorgesehenen Wells der Platte pipettiert. Die Platte wurde mit einem Deckel verschlossen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde die Platte 3x mit dem Hydroflex gewaschen. Während dessen wurde der Detektionsantikörper verdünnt. Hierfür wurde der biotinylierte Detektionsantikörper im Verhältnis 1:500 (Antikörper:Blockierungslösung) mit Blockierungslösung verdünnt. Nun wurde jeweils 100 µl der Antikörperverdünnung pro Well der ELISA-Platte pipettiert und die Platte wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einer Stunde wurde die ELISA-Platte erneut 3x gewaschen. Die Streptavidin-HRP wurde im Verhältnis von 1:1.000 mit Blockierungslösung verdünnt. Von der Streptavidin-HRP-Verdünnung wurden jeweils 100 µl pro Well pipettiert. Die ELISA-Platte wurde im Anschluss für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die ELISA-Platte 6x gewaschen. Währenddessen wurde die Substrat-Lösung angesetzt. Hierfür wurden Konjugat A (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, BD) und Konjugat B (Wasserstoffperoxid, BD) im Verhältnis 1:1 gemischt. Von der Substrat-Lösung wurden dann 100 µl pro Well pipettiert. Die Platte wurde anschließend für 5-10 Minuten in Dunkelheit inkubiert, bis eine Blaufärbung der Wells stattgefunden hat. Dann wurden pro Well jeweils 50 µl der Stopp-Lösung (BD) pipettiert, dies ließ einen Farbumschlag zu gelb beobachten. Die Konzentrationen von IL-10 wurden im ELISA-Reader Sunrise (Tecan) bei 450 nm ausgelesen. Zur Überprüfung der korrekten Verdünnungsstufen des Standards wurden diese in einem Diagramm aufgetragen. Der entstandene Graph sollte einen linearen Anstieg zeigen. Verdünnungsstufen, die zu sehr von der linearen Kurve abwichen, wurden ausgeschlossen, bei zu vielen Abweichungen von Verdünnungsstufen musste der Standard erneut verdünnt, vorbereitet und separat eingelesen werden.

### 2.5.3 IL-12 ELISA

Für das IL-12 ELISA-Assay wurden die Überstände von 24 h mit LPS stimulierten und nicht stimulierten C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs verwendet.

Die Messung wurde mit dem Mouse IL-12 (p70) ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe Set von BioLegend durchgeführt.

Am ersten Tag wurden die 96 well-Platte (Nunc MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific) mit den Anti-Maus IL-12 Capture-Antikörpern (BioLegend) beschichtet.

Hierfür wurde der im Set enthaltene Coating-Puffer 5x mit durch einen Mikrofilter (Merck-Millipore) filtriertem deionisiertem Wasser im Verhältnis 1:5 (Puffer: H<sub>2</sub>O) verdünnt. Die Capture-Antikörper (BioLegend) wurden mit dem verdünnten Coating-Puffer im Verhältnis 200:1 (Puffer:Antikörper) verdünnt und gut vermischt. Von dieser Antikörper-Verdünnung wurden jeweils 100 µl pro Well pipettiert. Nun wurde die ELISA-Platte über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Platte aus dem Kühlschrank entnommen und im ELISA-Washer (Hydroflex, Tecan) 3x gewaschen. Hierzu wurde ein Waschpuffer bestehend aus PBS (Gibco) und 0,05% Tween-20 (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Währenddessen wurde die Blockierungslösung aus dem Assay Diluent A (5x) und PBS angesetzt. Hierfür wurde der Assay Diluent im Verhältnis 1:5 (Diluent:PBS) mit PBS verdünnt. Nun wurden pro Well 200 µl der Blockierungslösung pipettiert und die Platte wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurde der IL-12 Standard (BioLegend) aus dem -80°C-Schrank entnommen und auf Eis aufgetaut. Es wurden neun Eppendorf-Cups vorbereitet, in acht dieser Eppendorf-Cups wurden 500 µl der Blockierungslösung pipettiert und in einen Cup 900 µl. Der aufgetaute Standard wurde nun in zwei Schritten mit der Blockierungslösung insgesamt um den Faktor 1.000 verdünnt. Im ersten Schritt wurde eine Vorverdünnung um den Faktor 100 durchgeführt, hierfür wurden 5 µl IL-12 Standard zu 495 µl Blockierungslösung pipettiert sorgfältig mit dem Vortex vermischt. Im zweiten Schritt wurde die Vorverdünnung um den Faktor 100 weiterverdünnt. Hierzu wurden 100 µl der Vorverdünnung entnommen und mit 900 µl der Blockierungslösung gemischt. Diese Verdünnung entsprach nun der höchsten IL-12 Konzentration von 1.000 pg/ml, die als Kontrolle für das ELISA-Assay diente. Zur Erstellung der weiteren Kontroll-Konzentrationen für die Messung wurde der höchsten Konzentration 500 µl entnommen und mit 500 µl Blockierungslösung gemischt und so im Verhältnis 1:1 verdünnt. Dieser Schritt wurde 8x wiederholt bis im letzten Eppendorf-Cup eine IL-12 Konzentration von 7,8 pg/ml erreicht wurde.

Die für 1 h mit Blockierungslösung inkubierte ELISA-Platte wurde nun erneut mit dem ELISA-Washer 3x gewaschen. Anschließend wurden alle Proben, stimuliert

und nicht stimuliert, nach vorher erstelltem Plan pipettiert. Hierfür wurden jeweils 100 µl einer Probe in das vorgesehene Well pipettiert. In die ersten beiden Reihen der Platte wurden 100 µl der verschiedenen Verdünnungsstufen des Standards und in die unterste Zeile 100 µl Blockierungslösung als 0 pg/ml Standard pipettiert. Die Platte wurde verschlossen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach 2 h wurde die Platte wiederum 3x mit dem Hydroflex gewaschen. Die Detection-Antikörper (BioLegend) wurden im Verhältnis 1:200 (Antikörper:Blockierungslösung) mit Blockierungslösung verdünnt. Von den verdünnten Detection-Antikörpern wurden je 100 µl pro Well pipettiert, die Platte wurde anschließend für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss an die erneute Inkubation wurde die Platte wieder 3x mit dem Hydroflex gewaschen. Die Avidin-HRP (BioLegend; Avidin-Horseradish-Peroxidase engl. für Meerrettichperoxidase) wurde im Verhältniss 1:1.000 mit Blockierungslösung verdünnt (HRP:Blockierungslösung). Nach dem Waschen wurde nun jeweils 100 µl der verdünnten HRP pro Well pipettiert und die Platte für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde die Platte 6x im Hydroflex gewaschen. Dann wurden in jedes Well 100 µl der Substrat-Lösung D (BioLegend) pipettiert und die Platte in Dunkelheit und bei Raumtemperatur für 3-5 Minuten inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 50 µl der Stopp-Lösung (BioLegend) in jedes Well pipettiert und im Zuge dessen wurde ein Farbumschlag zu gelb beobachtet. Die Platte wurde im ELISA-Reader (Tecan Sunrise) bei 450 nm ausgelesen. Zur Überprüfung der korrekten Verdünnungsstufen des Standards wurden diese in einem Diagramm aufgetragen. Der entstandene Graph sollte einen linearen Anstieg zeigen. Verdünnungsstufen, die zu sehr von der linearen Kurve abwichen, wurden ausgeschlossen, bei zu vielen Abweichungen von Verdünnungsstufen musste der Standard erneut verdünnt, vorbereitet und separat eingelesen werden.

## 2.6 Durchflusszytometer

Die aufbereiteten und gefärbten Zellen wurden mit den LSR Fortessa Durchflusszytometer der Firma BD analysiert. Der LSR Fortessa verfügte über



vier Laser: violett 420 nm, blau 488 nm, grün/gelb und rot 640 nm. Das Durchflusszytometer verfügte über 16 Kanäle, davon sechs violette, zwei blaue, fünf grün/gelbe und drei rote Kanäle.

## 2.7 Software zur Analyse der Rohdaten

Zur Analyse der Rohdaten wurde die Software FlowJo Versionen 10.1 bis 10.7 der Firma BD (seit 2017) verwendet.

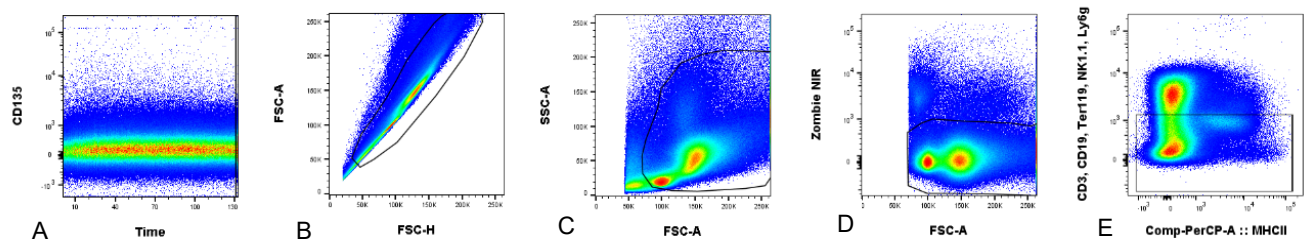
## 2.8 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde mit der Software Prism Version 8 der Firma Graphpad durchgeführt. Für den Vergleich eines Merkmals zweier Gruppen wurde der ungepaarte Students T-Test verwendet. Für den Vergleich eines Merkmals mehrerer Gruppen wurde ein Oneway-Anova mit Šidák als Post-Test verwendet.

# 3 Ergebnissteil

## 3.1 Der FPR2 zeigt keinen Einfluss auf die Verteilung von DC-Vorläuferzellen im Knochenmark

Um die Hypothese, ob der FPR2 einen Einfluss auf die Reifung und Anzahl von DC-Vorläufern im Knochenmark hat, zu untersuchen, wurden Zellen aus dem Knochenmark von FPR2<sup>-/-</sup> und C57BL/6- Mäusen analysiert. Hierzu wurde das Knochenmark beider Femora entnommen und die enthaltenen Zellen isoliert. Die isolierten Zellen wurden mit Antikörpern gefärbt, die mit Fluorochromen markiert waren. Anschließend wurden die gefärbten Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

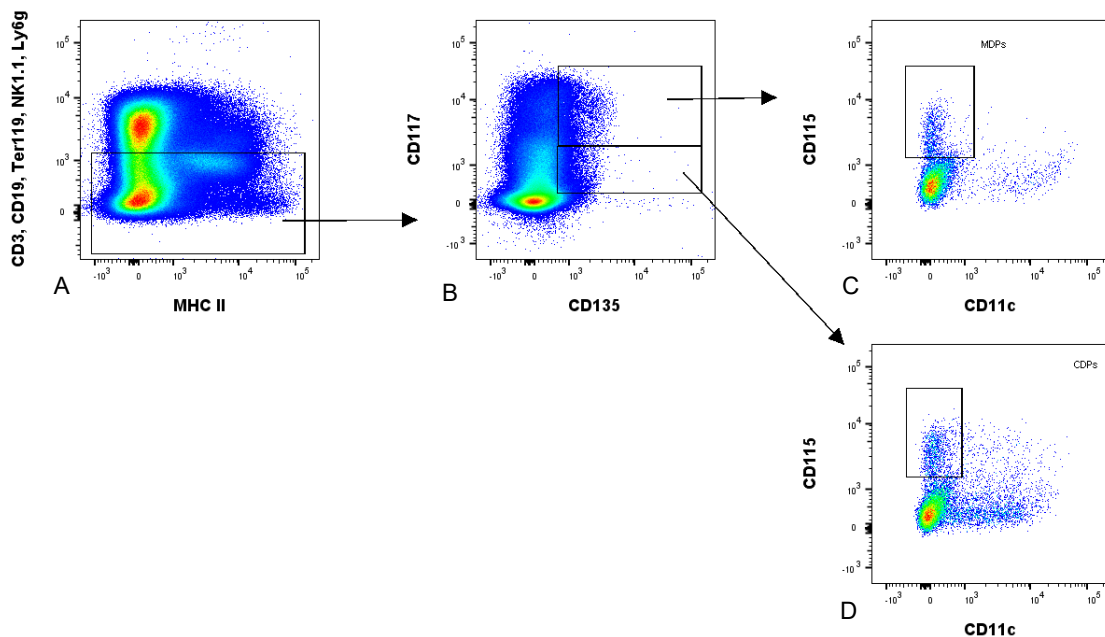


**Abbildung 1: Gating-Strategie zur Unterscheidung der Zielzellen von membranösen Debris und anderen Zellen im Knochenmark. (A) „Timegate“, (B) Einzelzellen, (C) Immunzellen, (D) lebende Zellen, (E) Ausschluss von T-, B- und NK-Zellen sowie Granulozyten und Erythrozyten**

Eine quantifizierbare Auswertung der durchflusszytometrisch erhobenen Daten erfolgte in der Software Flowjo anhand einer vorher festgelegten Gating-Strategie (Abb.1). Zum Ausschluss von Unregelmäßigkeiten bei der Messung wurden diese, falls vorhanden, durch das sogenannte „Timegate“ (engl. für Zeit) ausgeschlossen (Abb.1A). Anschließend wurden Detritus, zu kleine Zellen und große Konglomerate zusammenheftender Zellen durch ein Einzelzell-Gate aussortiert (Abb.1B). Hierfür wurden alle, in eine Probe gemessene Bestandteile anhand von FSC-H (forward scatter-height) und FSC-A (forward scatter-area) bzgl. ihrer Größe beurteilt. Um Zellen der lymphatischen und myeloischen Reihe von weiterem zellulärem Debris zu unterscheiden, wurden alle Einzelzellen in einem Pseudocolor-Diagramm bezüglich ihrer Größe (FSC-A) und Granularität (SSC-A; side scatter-area) aufgetragen und lymphatische und myeloische Zellen wurden per Gate zur weiteren Analyse isoliert (Abb.1C). Zum Ausschluss toter Zellen, die ihre Membranintegrität durch den Isolations- und Färbeprozess verloren hatten, wurden die lebenden Zellen durch ein Gate isoliert. Dies geschah im Pseudocolor-Diagramm mit Zombie NIR als Lebend/Tot-Marker (Ordinate) und FSC-A (Abszisse), wobei der Cut-off im Vergleich mit der ungefärbten Kontrolle erfolgte (Abb. 1D).

Zur Unterscheidung zwischen DC-Vorläufern und anderen Zellen, wurde eine Diskrimination anhand von Lineage-Markern (lineage: engl. für Abstammung) durchgeführt. Lineage-Marker sind Oberflächeantigene, die charakteristisch für bestimmte Zellreihen sind. So wurden alle Zellen, die positiv für die Oberflächenantigene CD3 (T-Lymphozyten), CD19 (B-Lymphozyten), Ter119

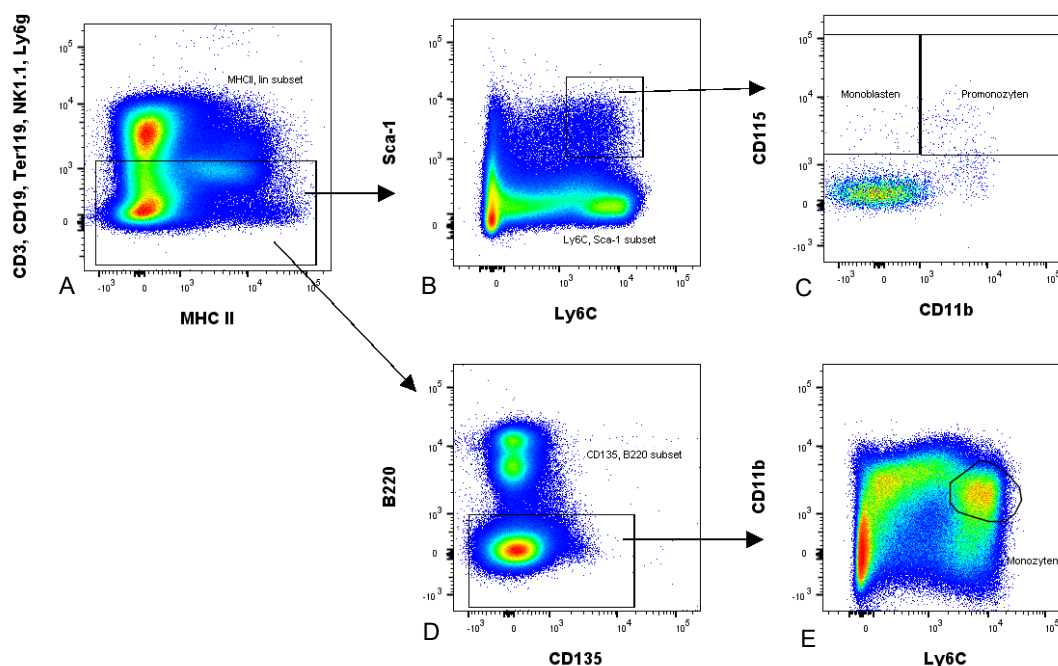
(Erythrozyten), NK1.1 (Natürliche Killerzellen) und Ly6G (Granulozyten) waren, aus der weiteren Analyse ausgeschlossen (s. Abb.1F, bzw. 2A,3A oder 4A). Diese Oberflächenantigene werden im weiteren als Lineage-Marker bezeichnet. Alle Lineage-Marker wurden mit dem Fluorochrom FITC angefärbt. Zur Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen wurde der Cut-off mithilfe einer FMO-Kontrolle (engl.: Fluorescence Minus One, s. Kapitel 2.4.1.) auf eine Intensität von  $<10^3$  festgelegt.



**Abbildung 2: Gating-Strategie zur Identifizierung von MDPs und CDPs:** (A) Lineage- Zellen, (B)  $CD135^+ CD117^{-/+}$  Population und  $CD135^+ CD117^+$  Population, (C)  $CD115^+ CD11c^-$  MDPs. (D)  $CD115^+ CD11c^-$  CDPs

Im nächsten Schritt wurden die lin<sup>-</sup> Zellen in einem Pseudocolorplot mit der Ausprägung von CD117 auf der Ordinate und der von CD135 auf der Abszisse aufgetragen. Es wurden Gates für zwei Populationen gesetzt: eine CD117 mittel bis hoch ausprägende  $CD135^+$  und eine CD117 negativ bis niedrig ausprägende  $CD135^+$  (Abb.2B). Die CD117 mittel bis hoch ausprägende  $CD135^+$  Population wurde anschließend in einem Pseudocolorplot mit CD115 auf der Ordinate und CD11c auf der Abszisse dargestellt. Hier stellten sich die MDPs als  $CD115^+ CD11c^-$  Zellen dar (Abb.2C). Die CD117 negativ bis niedrig ausprägende  $CD135^+$  Population wurde ebenfalls in einem Pseudocolorplot mit

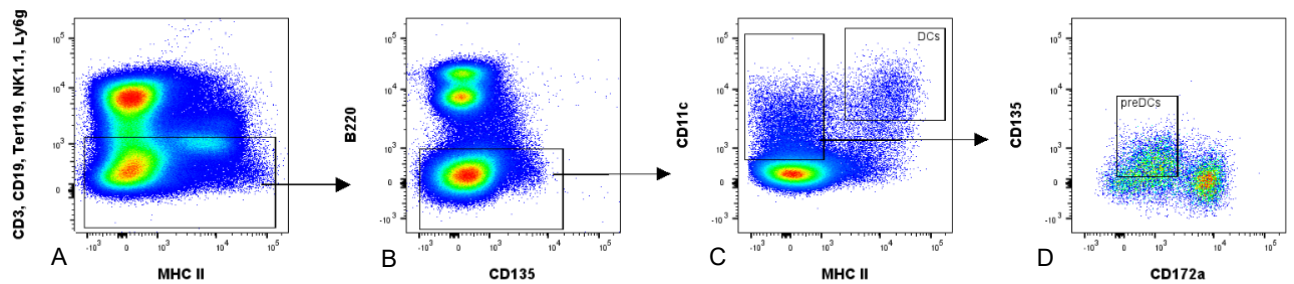
CD115 und CD11c aufgetragen. Die Population der CDPs zeigte sich als CD115<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> Zellen (Abb.2D).



**Abbildung 3: Gating-Strategie zur Identifizierung von Monozyten, Monoblasten und Promonozyten:** (A) Lin<sup>-</sup> Zellen, (B) Sca-1<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> Population, (C) CD115<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> Monoblasten und CD115<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Promonozyten. (D) B220<sup>-</sup> CD135<sup>+/-</sup> Population, (E) Ly6C<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Monozyten

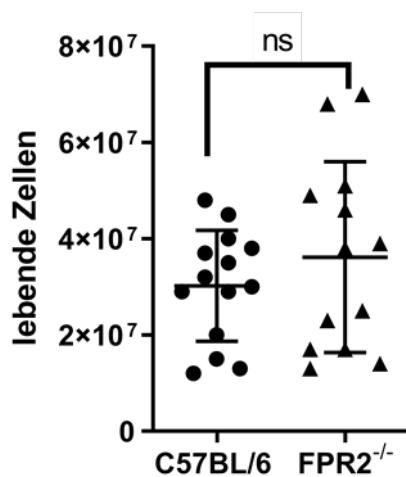
Die Lineage<sup>-</sup> Population wurde ebenfalls in einem Pseudocolorplot mit Sca-1 auf der Ordinate und Ly6C auf der Abszisse aufgetragen. Hier wurde mithilfe eines Gates eine Sca-1<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> Population identifiziert (Abb.3B), diese wurde in einem Diagramm mit CD115 auf der Ordinate und CD11b auf der Abszisse übertragen. Hier wurden die Monoblasten als CD115<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> und die Promonozyten als CD115<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Zellen identifiziert (Abb.3C).

Weiterhin wurde die Lineage<sup>-</sup> Population in einem Pseudocolor-Diagramm mit B220 auf der Ordinate und CD135 auf der Abszisse aufgetragen. In diesem Pseudocolor-Diagramm wurde die B220<sup>-</sup> CD135<sup>-</sup> bis niedrig ausprägende Population durch gating diskriminiert (Abb.3D). Diese Population wurde nun bezüglich ihrer Ausprägung von CD11b und Ly6C dargestellt. Hierbei zeigten sich die Population der Monozyten als CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> (Abb.3F).



**Abbildung 4: Gating-Strategie zur Identifizierung von DCs und pre-DCs:** (A) Lineage<sup>-</sup> Zellen, (B) B220<sup>-</sup> CD135<sup>+/-</sup> Population, (C) CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> DCs und CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>-</sup> Population, (D) CD135<sup>+</sup> CD172a<sup>-</sup> pre-DCs

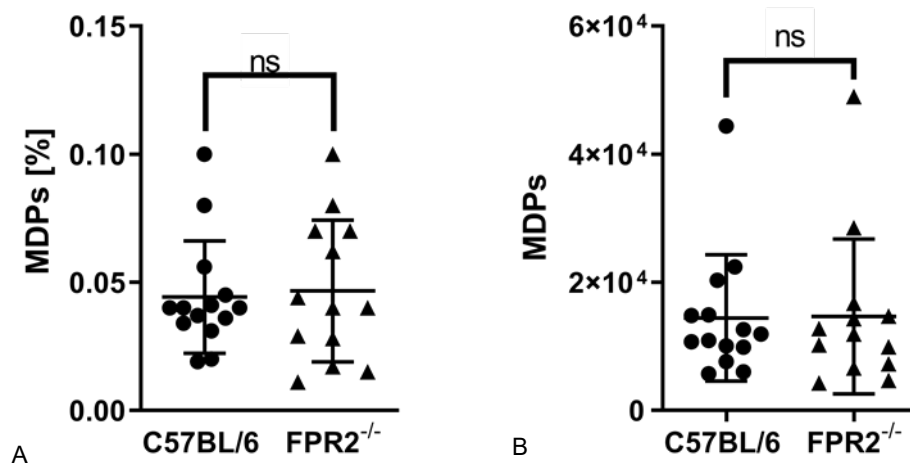
Weiterhin wurde die B220<sup>-</sup> CD135 negativ bis niedrig ausprägende Population in einem Pseudocolor-Diagramm mit CD11c auf der Ordinate und MHC II auf der Abszisse aufgetragen. Hier wurden zwei Populationen durch Gates differenziert. DCs zeigten sich hier als CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>hi</sup> Population (Abb.4C). Die zweite Population wurde als CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>-</sup> definiert. Diese CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>-</sup> Zellen wurden in einem Diagramm in Bezug auf ihre Ausprägung von CD135 und CD172a aufgetragen. Hier stellte sich die Population der preDCs als CD135<sup>+</sup> und CD172a negativ bis niedrig ausprägend dar (Abb.4D).



**Abbildung 5: Anzahl an lebenden Zellen im Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Bestimmung der Zellzahl pro Femur mittels Lichtmikroskop und Neubauer-Zählkammer. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test ( $p=0,3459$ ). Die Daten wurden in 3 Versuchen erhoben.

In der Tendenz zeigten die FPR2<sup>-/-</sup> Mäuse eine höhere Anzahl an lebenden Zellen im Knochenmark (Abb.5), die sich um einen Mittelwert von  $3,62 \times 10^7$

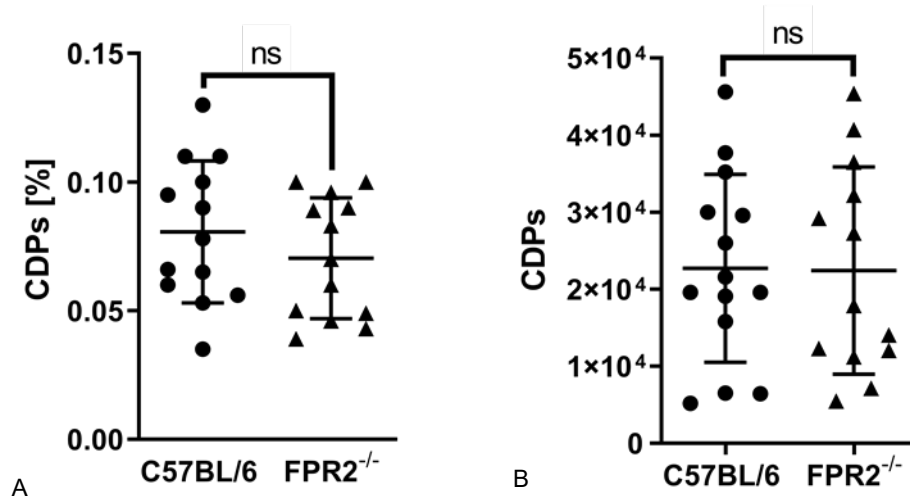
bewegte. Die Anzahl lebender Zellen im Knochenmark von C57BL/6-Mäusen betrug im Mittel  $3,02 \times 10^7$  Zellen. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,3459$ ). C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>- Mäuse verfügten also über vergleichbare Zahlen an lebenden Zellen im Knochenmark. Das früheste Stadium von DC Vorläuferzellen, das untersucht wurde, waren die MDPs (Abb.6).



**Abbildung 6: Relativer Anteil und absolute Anzahl an MDPs im Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um eine Auswertung der durchflusszytometrisch erhobenen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test. MDPs [%]:  $p=0,8038$ ; MDPs, absolut:  $p=0,9546$ . Die Daten wurden in 3 Versuchen erhoben.

In der prozentualen Verteilung kumulierten die Anteile der MDPs an den lebenden Zellen im Knochenmark der C57BL/6-Mäuse um den Mittelwert von 0,04421 %. Die prozentualen Anteile der MDPs unter den Zellen im Knochenmark der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse wies eine etwas größere Verteilung auf, der Mittelwert war mit 0,04662 % geringfügig höher als der der C57BL/6-Mäuse (Abb.6A). Dieser Unterschied zwischen FPR2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6- Mäusen erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ( $p=0,8038$ ). Die absoluten Zellzahlen der MDPs im Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen imponierten in der Verteilung der Werte ähnlich. Die Zahl an MDPs schwankte im Knochenmark der C57BL/6- Mäuse um einen Mittelwert von  $1,44 \times 10^4$  Zellen, bei den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen um einen Mittelwert von  $1,47 \times 10^4$  (Abb.6B). Die Anzahl der MDPs im Knochenmark der beiden Mausstämme zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,9546$ ). Die MDPs der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse unterschieden sich also nicht in ihrer

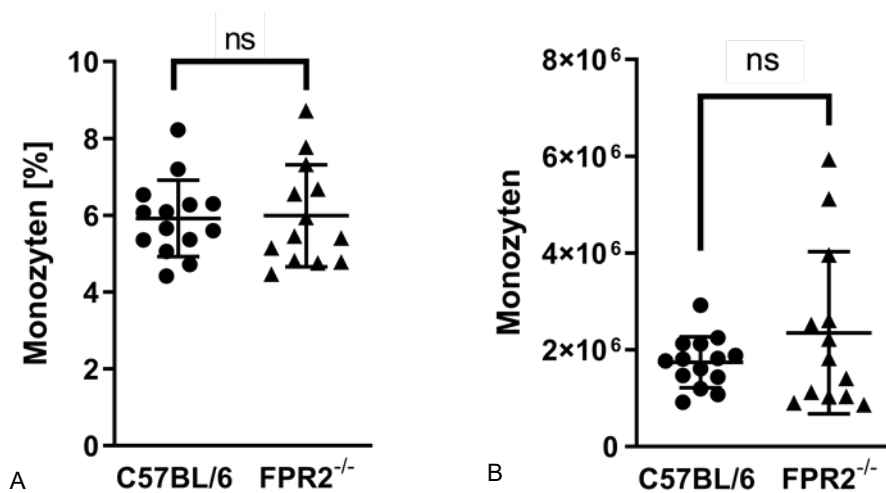
prozentualen Verteilung oder der absoluten Zahl der Zellen im Knochenmark von den MDPs der C57BL/6-Mäuse.



**Abbildung 7: Relativer Anteil und absolute Anzahl an CDPs im Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um eine Auswertung der durchflusszytometrisch erhobenen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test. CDPs [%]:  $p=0,3193$ ; CDPs, absolut:  $p=0,9528$ . Die Daten wurden in 3 Versuchen erhoben.

Im Weiteren erfolgte eine Analyse der CDPs, die sich als Vorläuferzellen aus MDPs differenzieren. Der prozentuale Anteil der C57BL/6- Mäuse schwankte um den Mittelwert von 0,08062 %. Die Population der CDPs im Knochenmark der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigte dagegen einen mittleren Anteil von 0,07038 % der Zellen (Abb.7A). Bei FPR2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6- Mäusen im Vergleich zeigte der prozentuale Anteil der CDPs an den lebenden Zellen im Knochenmark keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,3193$ ). Die absolute Anzahl von CDPs im Knochenmark von C57BL/6-Mäusen betrug  $2,27 \times 10^4$  Zellen im Mittel (Abb.7B). Dies ist fast identisch zu den CDPs im Knochenmark der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse, dort betrug der Mittelwert  $2,24 \times 10^4$ . Auch in Bezug auf die absolute Menge der CDPs im Knochenmark konnte bei beiden Mausstämmen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p=0,9528$ ). Der relative Anteil der CDPs an den lebenden Zellen und deren absolute Anzahl im Knochenmarks von C57BL/6-Mäusen unterschied sich also nicht von den CDPs im Knochenmark der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse. Um zu überprüfen, ob der FPR2 Einfluss auf die Differenzierung der MDPs in entweder DCs oder in Monozyten hat, wurden die Monozyten-Populationen der

beiden Mausstämmen analysiert. Es sollte herausgefunden werden, ob durch den fehlenden FPR2 eine veränderte Priorität in der Differenzierung der MDPs in DCs oder Monozyten besteht.

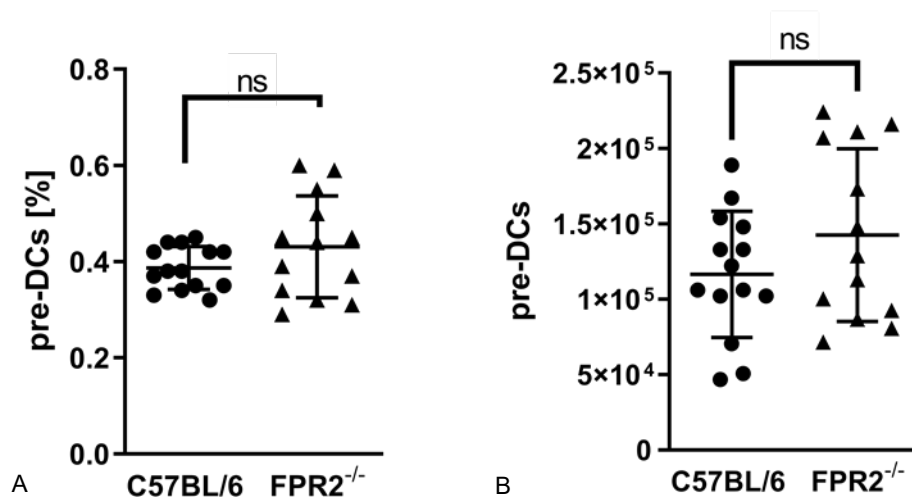


**Abbildung 8: Relativer Anteil und absolute Anzahl an Monozyten im Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test. Monozyten [%]:  $p=0,7556$ ; Monozyten, absolut:  $p=0,1424$ . Die Daten wurden in 3 Versuchen erhoben.

Die Werte der relativen Anteile beider Mauslinien sind im Diagramm gleich verteilt. Der prozentuale Anteil der Monozyten im Knochenmark von C57BL/6-Mäusen schwankte im Streudiagramm um einen Mittelwert von 5,849% der Zellen (Abb.8A). Der Anteil von Monozyten im Knochenmark der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse betrug 5,988% im Mittel. Die Monozyten beider Mausstämmen im Vergleich konnten bezüglich ihres prozentualen Anteils an den lebenden Zellen im untersuchten Knochenmark keinen signifikanten Unterschied zeigen ( $p=0,7556$ ). Die absolute Anzahl an Monozyten im untersuchten Knochenmark schien in der Tendenz bei den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen mit einem Mittelwert von  $2,35 \times 10^6$  Zellen höher als im Knochenmark der C57BL/6-Mäuse zu sein, deren Monozyten um eine Anzahl von  $1,64 \times 10^6$  Zellen im Mittel schwankte (Abb.8B). Die Werte der FPR2<sup>-/-</sup>-Monozyten zeigten eine breitere Streuung als die der C57BL/6-Monozyten. Der Unterschied der Zahlen an Monozyten im untersuchten Knochenmark der beiden Mauslinien war nicht signifikant ( $p=0,1424$ ). Zwischen C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-



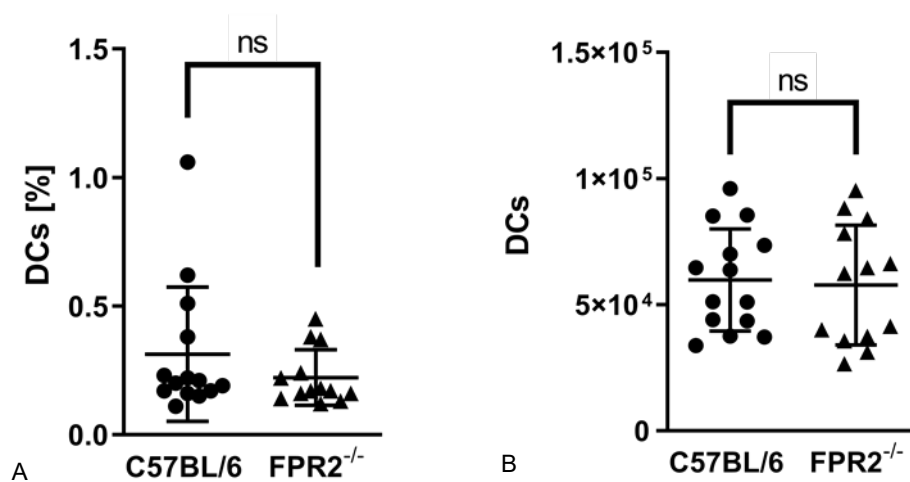
Mäusen wurden keine Unterschiede, weder im prozentualen Anteil der lebenden Zellen noch in der absoluten Anzahl an Monozyten im Knochenmark entdeckt. Im Stadium der pre-DCs verlassen die Vorläuferzellen der DCs das Knochenmark. Zur Klärung der Fragestellung, ob der FPR2 einen Einfluss auf diesen Prozess, bzw. auf die Zahl der pre-DCs hat, wurde diese Population im Knochenmark ebenfalls untersucht.



**Abbildung 9: Relativer Anteil und absolute Anzahl an pre-DCs im Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test. pre-DCs [%]:  $p=0,1626$ ; pre-DCs, absolut:  $p=0,1862$ . Die Daten wurden in 3 Versuchen erhoben.

Der prozentuale Anteil der pre-DCs an den lebenden Zellen des Knochenmarks der C57BL/6-Mäuse bewegte sich um einen Mittelwert von 0,3864 % (Abb.9A). Die pre-DCs im untersuchten Knochenmark der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse machten einen Anteil von 0,4308 % im Mittel aus. Die Werte der relativen Anteile an pre-DCs im Knochenmark von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen schienen breiter verteilt zu sein als die der C57BL/6-pre-DCs. Im prozentualen Anteil der pre-DCs an den lebenden Zellen im Knochenmark konnten im Vergleich von FPR2<sup>-/-</sup>- und BL/6-Mäusen keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden ( $p=0,1626$ ). Die absolute Anzahl der pre-DCs im Knochenmark der C57BL/6-Mäuse betrug im Mittelwert  $1,16 \times 10^5$  Zellen. Die mittlere Anzahl der pre-DCs im Knochenmark von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen war mit  $1,42 \times 10^5$  Zellen höher. Dieser Unterschied der absoluten Zahl von pre-DCs im Knochenmark von FPR2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6-Mäusen erreichte jedoch kein

signifikantes Ausmaß ( $p=0,1862$ ) (Abb.9A). Anhand fehlender Unterschiede zwischen den relativen Anteilen und den absoluten Zahlen der pre-DCs im untersuchten Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ist also nicht von einer veränderten Abwanderung der pre-DCs aus dem Knochenmark auszugehen. Abschließend wurde eine Analyse der differenzierten Dendritischen Zellen im Knochenmark durchgeführt. Hierbei wurde die DC-Population im Gesamten betrachtet.



**Abbildung 10: Relativer Anteil und absolute Anzahl an DCs im Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test. DCs [%]:  $p=0,2694$ ; DCs, absolut:  $p=0,8708$ . Die Daten wurden in 3 Versuchen erhoben.

Der prozentuale Anteil der DCs im Knochenmark der C57BL/6-Mäuse zeigte mit einem Mittelwert von 0,3073% einen etwas höheren Anteil als der im Knochenmark der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse mit 0,2223% (Abb.10A). Der Unterschied im prozentualen Anteil der DCs an den lebenden Zellen des Knochenmarks von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen erreichte keine signifikanten Ausmaße ( $p=0,2694$ ). In der absoluten Zellzahl der DCs im Knochenmark zeigte sich bei C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen recht ähnliche Werte. Die Mittelwerte der Zellzahlen zeigten mit  $5,63 \times 10^4$  (C57BL/6) und  $5,78 \times 10^4$  (FPR2<sup>-/-</sup>) wenig Differenz. Es fiel auf, dass trotz höherer prozentualer Anteile der DCs im Knochenmark von C57BL/6-Mäusen die absoluten Zellzahlen im Knochenmark

der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse gleichwertig hoch waren (Abb.10B). Ebenso konnte bei der absoluten Zahl an Dendritischen Zellen im untersuchten Knochenmark keine signifikante Differenz ( $p=0,8708$ ) zwischen FPR2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6-Mäusen festgestellt werden. Die DCs im Knochenmark von FPR2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6-Mäusen zeigten also weder in Bezug auf ihre prozentualen Anteile noch auf ihre absoluten Zellzahlen Unterschiede.

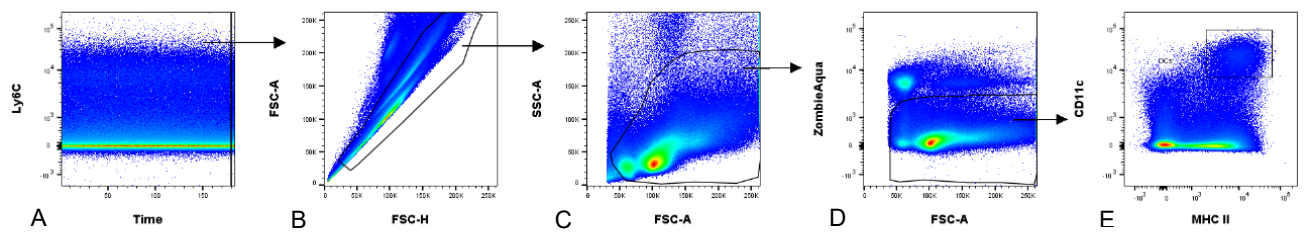
In diesen Versuchen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen FPR2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6-Mäusen gezeigt werden.

Es konnten keine signifikant unterschiedlichen prozentualen Anteile zwischen den untersuchten Zellen der beiden Mausstämme an der Gesamtheit der lebenden Zellen im Knochenmark ermittelt werden.

Auch die absolute Anzahl an Zellen im Knochenmark konnte im Vergleich zwischen FPR2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6-Mäusen weder bei differenzierten DCs noch bei ihren Vorläuferzellen oder den Monozyten signifikante Unterschiede zeigen.

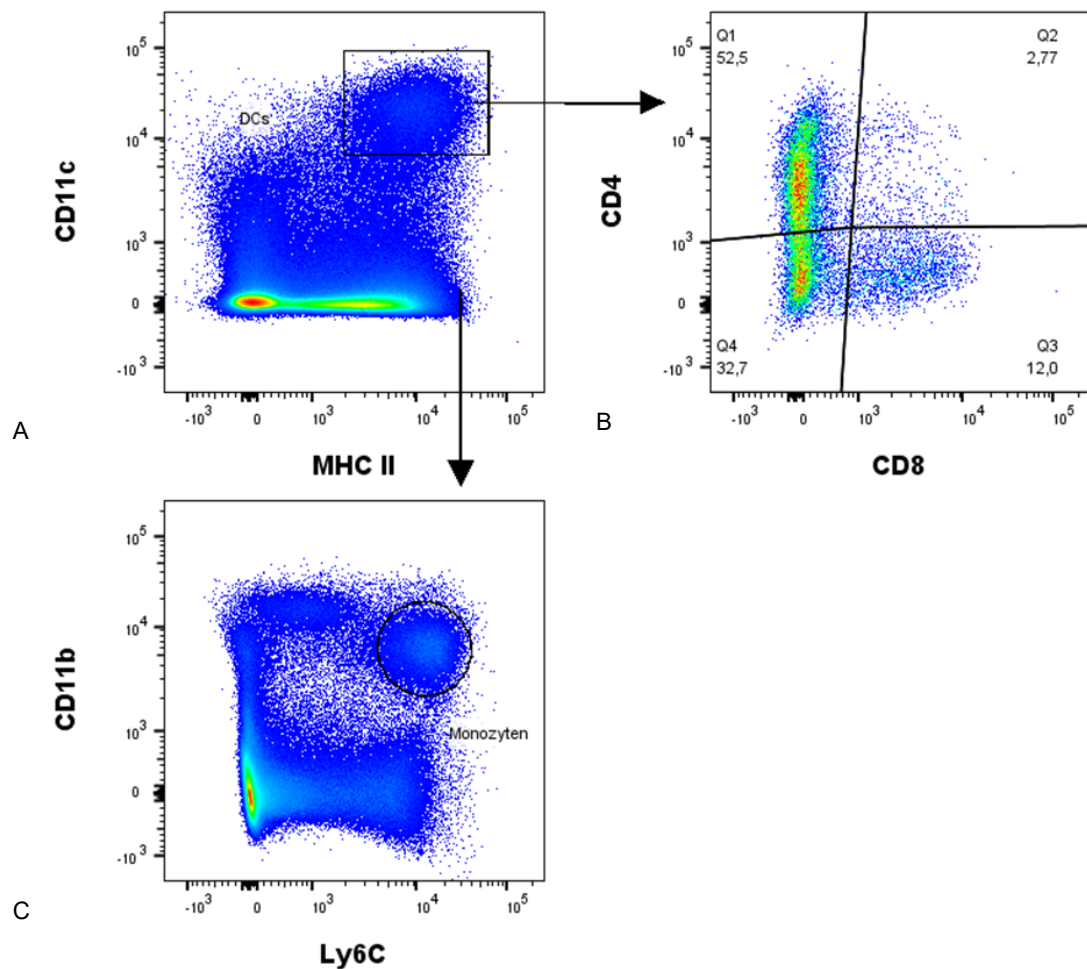
### 3.2 C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen unterschiedliche Verteilungen von DC-Subpopulationen in der Milz

In präliminären Versuchen wurden Unterschiede bezüglich der Zahl von DCs in den Splenes von FPR2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6- Mäusen beobachtet. Deshalb sollte die Hypothese, dass der FPR2 die Homöostase Dendritischer Zellen und ihrer Subpopulationen in der Milz beeinflusst, untersucht werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde gesunden FPR2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6- Mäusen jeweils die Milz entnommen. DCs und Lymphozyten wurden aus dem Milzgewebe isoliert und mithilfe von flouorchrommarkierten Antikörpern gefärbt. Anschließend wurden die Zellen der FPR2<sup>-/-</sup>- und BL/6-Mäuse vergleichend durchflusszytometrisch analysiert.



**Abbildung 11: Gating-Strategie zur Unterscheidung der Zielzellen von membranösen Debris und anderen milzständigen Zellen. (A) „Timegate“, (B) Einzelzellen, (C) Immunzellen, (D) lebende Zellen, (E) DCs**

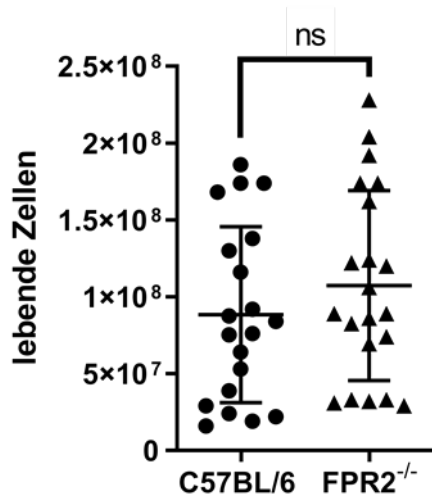
Die DCs wurden anhand folgender Gating-Strategie identifiziert. Um mögliche Unregelmäßigkeiten, während der durchflusszytometrischen Analyse, ausschließen zu können, wurden Auffälligkeiten im zeitlichen Ablauf der Messung identifiziert. Dies geschah in einem Pseudocolor-Diagramm mit dem Faktor Zeit auf der Abszisse und MHC II auf der Ordinate. Auffällige Bereiche auf dem Zeitstrahl wurden durch ein sogenanntes „Timegate“ nicht in die weitere Analyse einbezogen (Abb.11A). Die durch das „Timegate“ ausgewählten Zellen wurden nun in einem Pseudocolor-Diagramm mit FSC-H auf der Abszisse und FSC-A auf der Ordinate aufgetragen (Abb.11B). Durch die so ermittelte Größe konnten Einzelzellen des Immunsystems von Detritus, Erythrozyten, Thrombozyten und Konglomeraten mehrerer Zellen unterschieden werden. Die Einzelzellen des Immunsystems wurden im Anschluss anhand ihrer Granularität (durch SSC-A) in Abhängigkeit ihrer Größe (FSC-A) in einem Pseudocolor-Diagramm aufgetragen. Hier wurden gemessene Zellen, die zu klein und/oder ein zu hohes Maß an Granularität besaßen, durch das Ziehen eines Gates ausgeschlossen (Abb.11C). Dies half membranösen Debris, der in der weiteren Analyse die Ergebnisse verfälschen könnte, auszuschließen. Die durch das Gate unterschiedenen Zellen wurden nun in einem Pseudocolorplot mit FSC-A auf der Abszisse und der Anreicherung mit dem Lebend/Tot-Fluorochrom Zombie Aqua auf der Ordinate aufgetragen (Abb.11D). So konnten tote von lebenden Zellen unterschieden werden. Der Cut-off für das Gate wurde, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, mithilfe der ungefärbten Zellen ermittelt.



**Abbildung 12: Gating-Strategie zur Identifizierung von DCs, DC-Subpopulationen und Monozyten:** (A) CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> DCs und CD11c<sup>-</sup> MHC II<sup>-</sup> Zellen als „Not-Gate“, (B) CD4<sup>+</sup> DCs (Q1), CD8<sup>+</sup> DCs (Q3), CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs (Q4). (C) CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> Monozyten

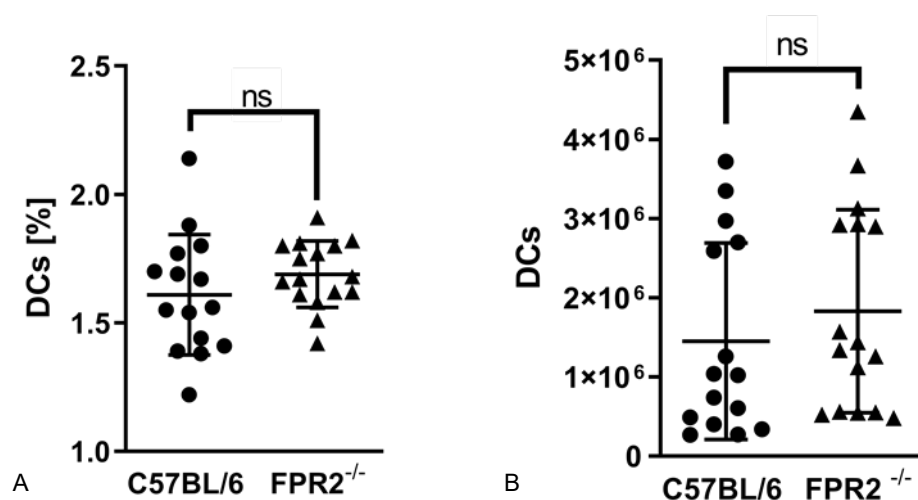
Die lebenden Zellen wurden nun in einem Diagramm mit CD11c (Ordinate) und MHC II (Abszisse) aufgetragen. Die Population der milzständigen DCs wird hier als CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>hi</sup> Zellen identifiziert (Abb.12A). Alle lebenden Zellen, die nicht der DC-Population zugeordnet werden konnten, wurden in ein Diagramm übertragen und in Bezug auf ihre Ausprägung von CD11b und Ly6C betrachtet. Hier wurden die Monozyten als Ly6C<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Zellen identifiziert (Abb.12C). Die DCs wurden in einem weiteren Schritt in einem Pseudocolor-Diagramm mit CD4 auf der Ordinate und CD8 auf der Abszisse aufgetragen, um drei DC Subpopulationen differenzieren zu können. Die Grenzen der Gates wurden anhand von FMO-Kontrollen ermittelt. Eine DC-Subpopulation zeigte sich als

CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DCs. Eine andere DC-Population konnte als CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> identifiziert werden. Im Weiteren fiel noch eine Population von CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs auf (Abb.12B).



**Abbildung 13: Lebende Zellen in der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Hochrechnung von Zellzählungen mithilfe des Gerätes Countess (Invitrogen). Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test ( $p=0,3143$ ). Die Daten wurden in 4 Versuchen erhoben.

Die Gesamtzahl aller lebenden Zellen stellte sich als sehr variabel zwischen allen, in den Versuchen eingesetzten, Mäusen dar. Die Unterschiede der Mittelwerte zwischen C57BL/6- ( $8,83 \times 10^7$  Zellen) und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $1,07 \times 10^8$  Zellen) könnten zwar auf eine Tendenz hinweisen, die statistische Analyse zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,3143$ ). Die FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten also keine höheren Zahlen an lebenden Zellen in der Milz (Abb.13).



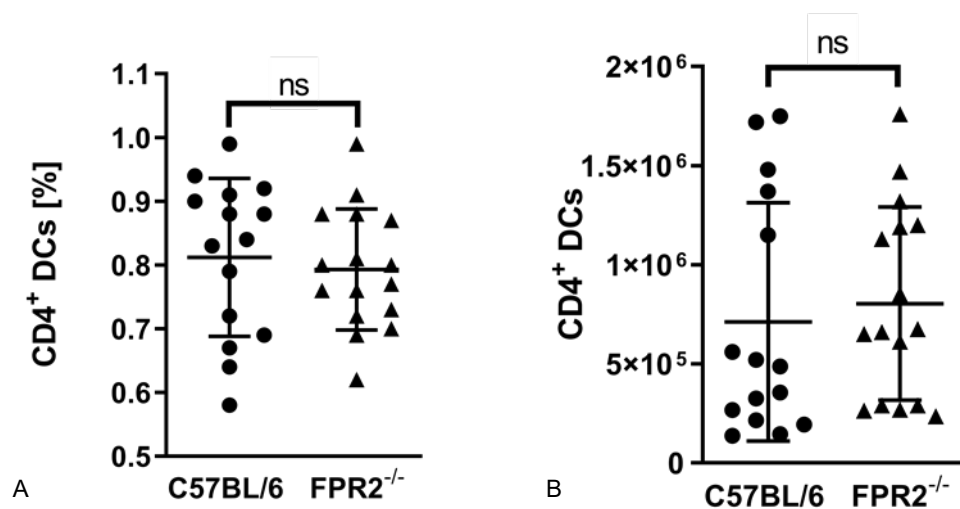
**Abbildung 14: Relativer Anteil und absolute Anzahl an DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test. DCs [%]:  $p=0,2437$ ; DCs, absolut:  $p=0,4094$ . Die Daten wurden in 4 Versuchen erhoben.

Der prozentuale Anteil der DCs in den Splenes beider Mausstämme kumulierte hauptsächlich zwischen 1-2 %. Die Mittelwerte beider Mausstämme unterschieden sich mit 1,609 % (C57BL/6) und 1,689 % (FPR2<sup>-/-</sup>) nur sehr geringfügig (Abb.14A). Dementsprechend wurde auch kein signifikanter Unterschied ( $p=0,2437$ ) bzgl. der prozentualen Verteilung der DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet.

Die absoluten Zellzahlen der DCs in den Splenes von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen stellten sich bei beiden Mausstämmen sehr variabel dar (Abb.14B). Die Mittelwerte unterschieden sich mit  $1,45 \times 10^6$  (C57BL/6) und  $1,83 \times 10^6$  (FPR2<sup>-/-</sup>) DCs im Durchschnitt pro Splen. Aufgrund der hohen Variabilität erreichten die Unterschiede jedoch kein signifikantes Niveau ( $p=0,4094$ ).

Die Beobachtungen der präliminären Versuche, dass die relativen und absoluten Zahlen von DCs in den Splenes von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen höher sind als in denen von C57BL/6-Mäusen, bestätigten sich also nicht.

Zur weiteren Überprüfung der Hypothese wurden die einzelnen Subpopulationen der DCs in den Splenes der Mäuse untersucht.

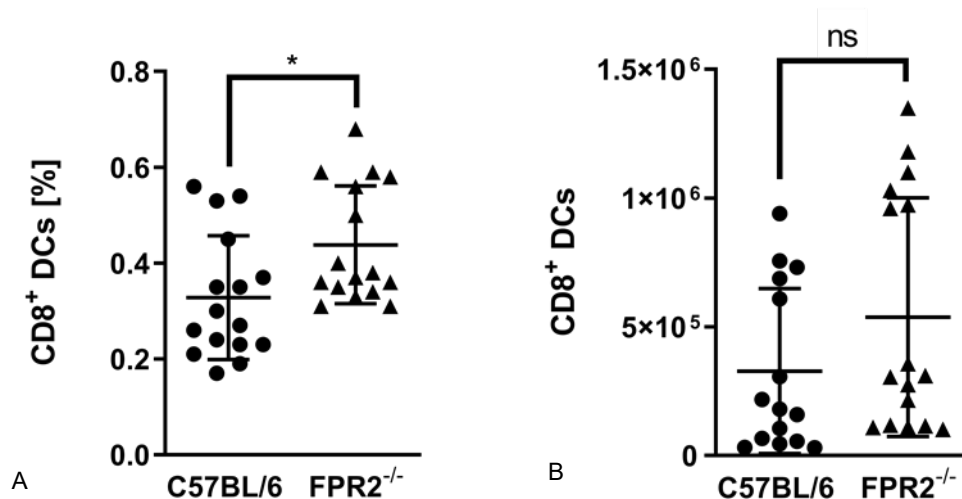


**Abbildung 15: Relativer Anteil und absolute Anzahl an CD4<sup>+</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test. CD4<sup>+</sup> DCs [%]:  $p=0,6362$ ; CD4<sup>+</sup> DCs, absolut:  $p=0,6403$ . Die Daten wurden in 4 Versuchen erhoben.

Die prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup> DCs an den lebenden Zellen in den Splenes beider Mauslinien verteilte sich in einem Bereich zwischen 0,5 und 1 %. Die Mittelwerte von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten mit 0,8120 % (C57BL/6) und 0,7931 % (FPR2<sup>-/-</sup>) eine Differenz von 0,0189 % (Abb.15A). In der statistischen Analyse stellte sich diese Differenz als nicht signifikant dar ( $p=0,6362$ ).

Die absoluten Zellzahlen der C57BL/6-Mäuse variierten zwischen  $1,30 \times 10^5$  und  $1,75 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> DCs, die Zellzahlen der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse rangierten zwischen  $1,10 \times 10^5$  und  $1,76 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> DCs (Abb.15B). Die Mittelwerte der beiden Mauslinien unterschieden sich mit  $7,12 \times 10^5$  (C57BL/6) und  $8,04 \times 10^5$  (FPR2<sup>-/-</sup>) CD4<sup>+</sup> DCs pro Splen. Die absoluten CD4<sup>+</sup> DC Zellzahlen von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,6403$ ) in der statistischen Analyse. Es konnten als keine höheren prozentualen Anteile oder Zellzahlen an CD4<sup>+</sup> DCs in der Milz von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigt werden.



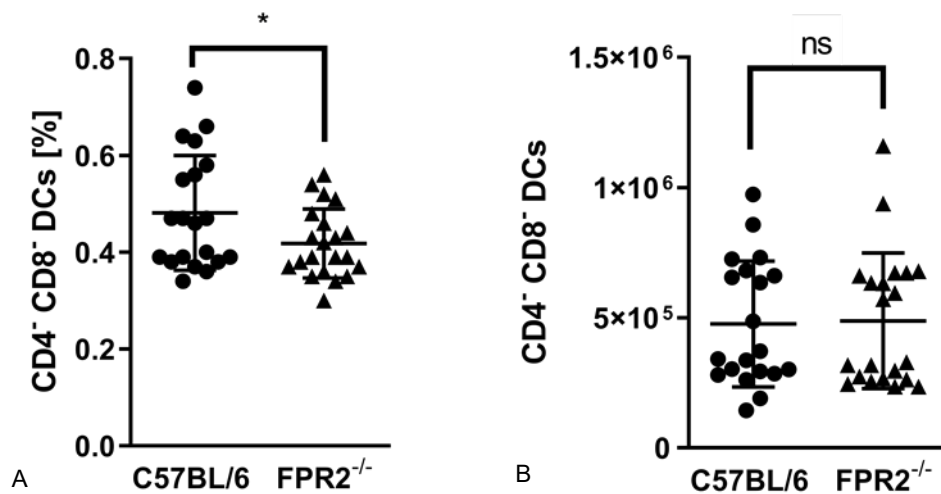


**Abbildung 16: Relativer Anteil und absolute Anzahl an CD8<sup>+</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test. CD8<sup>+</sup> DCs [%]:  $p=0,0196$ ; CD8<sup>+</sup> DCs, absolut:  $p=0,1558$ . Die Daten wurden in 4 Versuchen erhoben.

Der prozentuale Anteil der CD8<sup>+</sup> DCs an den lebenden Zellen der Milz bei C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte eine Tendenz von höheren Anteilen in den Splenes von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb.16A). Die prozentualen CD8<sup>+</sup> DC-Anteile bewegten sich bei den C57BL/6-Mäusen zwischen 0,15% und 0,6%, bei den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen zwischen 0,3% und 0,7%. Die Mittelwerte von C57BL/6- (0,3281 %) und FPR2<sup>-/-</sup>- Mäusen (0,4381 %) variierten um ca. 0,1 %. Die prozentualen Anteile der CD8<sup>+</sup> DCs in den Splenes von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen waren in der statistischen Analyse signifikant höher als die Anteile in den Splenes von C57BL/6-Mäusen ( $p=0,0196$ ).

Die Zellzahlen der CD8<sup>+</sup> DCs in den Splenes von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten große Schwankungen (Abb.16B). Beide Mausstämme imponierten in zwei Gruppen aufgeteilt, eine mit niedrigen Zellzahlen, die andere mit der 2- bis 3-fachen Anzahl an Zellen. Im Mittel variierten die Zellzahlen von C57BL/6- ( $3,28 \times 10^5$ ) und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $5,38 \times 10^5$ ) deutlich. Obwohl möglicherweise eine Tendenz der höheren CD8<sup>+</sup> DCs Zellzahlen in den Splenes der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse vorhanden ist, zeigte die statistische Analyse keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,1558$ ). In der Milz von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten sich also höhere prozentuale

Anteile an CD8<sup>+</sup> DCs als in der Milz von C57BL/6-Mäusen. Die CD8<sup>+</sup> DC-Zellzahlen in der Milz beider Mauslinien unterschieden sich jedoch nicht.



**Abbildung 17: Relativer Anteil und absolute Anzahl an CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test. CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DCs [%]:  $p=0,0433$ ; CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DCs, absolut:  $p=0,8757$ . Die Daten wurden in 4 Versuchen erhoben.

Die prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DCs an den lebenden Zellen wurden in einem Bereich zwischen 0,3% und 0,8% gemessen. Die CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DCs der C57BL/6-Mäuse zeigten etwas erhöhte Prozentwerte im Vergleich zu den CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DCs der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse (Abb.17A). Die Mittelwerte zeigten mit 0,4815% (C57BL/6) und 0,4181% (FPR2<sup>-/-</sup>) eine Differenz von 0,0634%. Der höhere prozentuale Anteil von CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DCs in der Milz von C57BL/6-Mäusen bestätigte sich in der statistischen Analyse als signifikant ( $p=0,0433$ ).

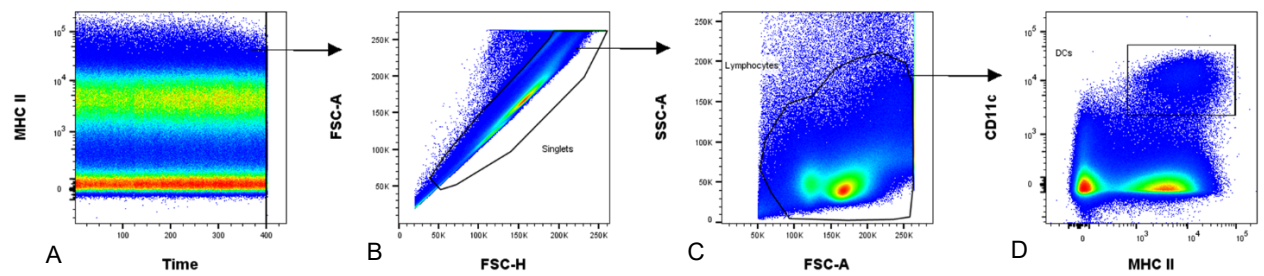
Die Zellzahlen der CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DCs zeigten eine ähnliche Verteilung der Werte, wie auch die CD8<sup>+</sup> DCs. Bei beiden Mauslinien kumulierten einige Werte zwischen  $1,5 \times 10^5$  und  $5 \times 10^5$  und weitere Werte gruppierten sich zwischen  $5 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$ . Die Mittelwerte von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten mit  $4,76 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DCs (C57BL/6) und  $4,88 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DCs (FPR2<sup>-/-</sup>) lediglich eine Differenz von  $1,23 \times 10^4$  Zellen (Abb.17B). Der Unterschied zwischen C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen bzgl. der Zahlen von CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DCs in den Splenes erreichte keine signifikanten Werte ( $p=0,8757$ ).

Es fiel auf, dass die absoluten Zellzahlen von CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs in den Splenes beider Mauslinien nah aneinander lagen, obwohl die Splenes der C57BL/6-Mäuse einen signifikant höheren prozentualen Anteil an CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs aufwiesen (Abb.17). Die Hypothese aus den präliminären Versuchen, dass die Zahlen der DCs im Milzgewebe von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen höher ausfallen, konnte also nicht bestätigt werden. Dennoch zeigten sich Unterschiede, besonders in den prozentualen Anteilen von CD8<sup>+</sup> DCs und CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs. Die FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten höhere Anteile an CD8<sup>+</sup> DCs, die C57BL/6-Mäuse höhere Anteile an CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs.

### 3.3 Der FPR2 beeinflusst das Überleben von Dendritischen Zellen und ihren Subpopulationen.

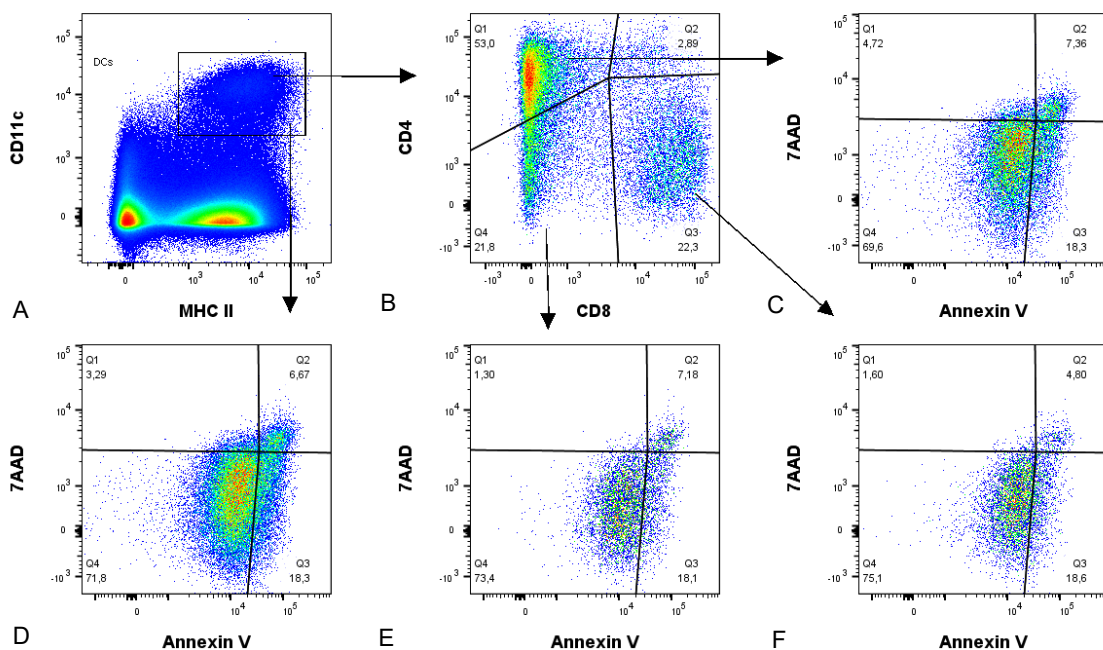
Um die Hypothese, dass der FPR2 die Apoptose Dendritischer Zellen in der Milz beeinflusst, zu untersuchen, wurde ein Apoptose-Assay im Durchflusszytometer durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen aus den Splenes von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>- Mäusen isoliert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt. Zusätzlich zu der extrazellulären Färbung wurden die Zellen noch mit Annexin V und 7AAD angefärbt. Annexin V kumuliert in diesem Fall nur in Zellen, die mit der Apoptose begonnen haben, 7AAD nur in Zellen die nekrotisch sind und somit ihre Zellintegrität verloren haben. Die Zellen wurden im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert. Zellen, die in der Analyse negativ für 7AAD und Annexin V waren, galten als lebend und nicht im Stadium der Apoptose. Annexin V<sup>+</sup> 7AAD<sup>-</sup> Zellen galten als früh-, Annexin V<sup>+</sup> 7AAD<sup>+</sup> Zellen als spätapoptotisch. Zellen, die Annexin V<sup>-</sup> 7AAD<sup>+</sup> waren, galten als nekrotisch. Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Versuche wurden alle Werte jeweils mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert.

Die in der Durchflusszytometrie erhobenen Daten wurden mit folgender Gating-Strategie analysiert.



**Abbildung 18: Gating-Strategie zur Unterscheidung der Zielzellen von membranösen Debris und anderen Zellen der Milz. (A) „Timegate“, (B) Einzelzellen, (C) Immunzellen, (D) DCs**

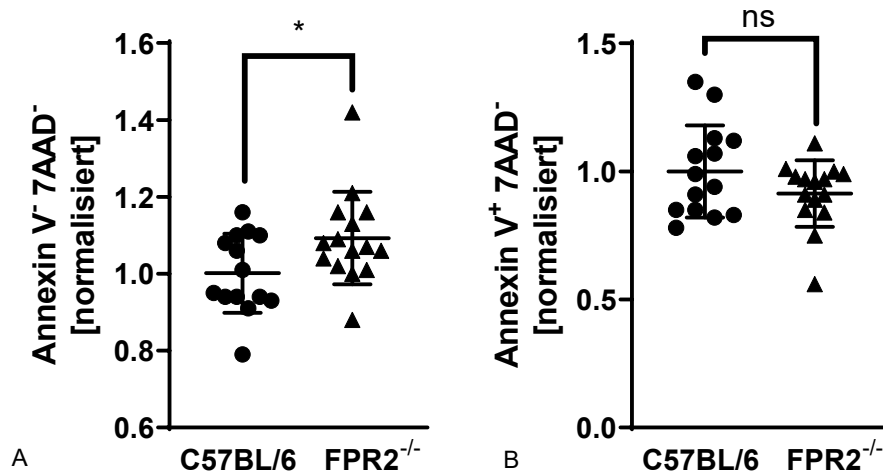
Wie in vorherigen Versuchen wurden mögliche Unregelmäßigkeiten, während der durchflusszytometrischen Analyse, durch ein „Timegate“ identifiziert und ausgeschlossen. Durch die, mit FSC-H und FSC-A ermittelte, Größe konnten Einzelzellen des Immunsystems von Detritus, Erythrozyten, Thrombozyten und Konglomeraten mehrerer Zellen unterschieden werden. Weiterer membranöser Debris wurde anhand von Granularität (durch SSC-A) und Größe (FSC-A) in einem Pseudocolor-Diagramm durch das Ziehen eines Gates von der weiteren Analyse ausgeschlossen (Abb. 18). Da der Zelltod, ob reguliert oder nicht reguliert, in diesem Fall Gegenstand der Analyse war, wurden tote Zellen nicht durch ein Gate von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen.



**Abbildung 19: Gating-Strategie zur Identifizierung von DCs und DC-Subpopulationen sowie zur Ermittlung der Bindung von Annexin V und 7AAD: Obere Reihe: (A) DCs, (B) CD4<sup>+</sup> DCs (Q1); CD8<sup>+</sup> DCs (Q3); CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs (Q4), (C) 7AAD/Annexin V-Bindung von CD4<sup>+</sup> DCs, (D) 7AAD/Annexin V-Bindung von DCs, (E) CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs, und (F) CD8<sup>+</sup> DCs.**

Die Zellen wurden nun in einem Pseudocolor-Diagramm mit CD11c auf der Ordinate und MHC II auf der Abszisse aufgetragen (Abb.19A). Die CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> Zellen wurden als DCs identifiziert. Die Population der DCs wurde auf ihre Ausprägung von CD4 und CD8 analysiert, um CD8<sup>+</sup> DCs und der CD4<sup>+</sup> DCs zu identifizieren. Ebenso konnten so CD8<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> DCs ermittelt werden (Abb.19B). Die Gesamtpopulation der DCs in der Milz sowie alle ihre Subpopulationen wurden im Weiteren in Bezug auf ihre Bindung von Annexin V und 7AAD analysiert. Annexin V<sup>-</sup> 7AAD<sup>-</sup> Zellen wurden als lebend definiert. Zellen, die Annexin V gebunden hatten, wurden als apoptotische Zellen angesehen, wobei die zusätzliche Bindung von 7AAD eine Information über das Stadium der Apoptose gab. Annexin V<sup>+</sup> 7AAD<sup>-</sup> befanden sich in einem frühen Stadium der Apoptose, Annexin V<sup>+</sup> 7AAD<sup>+</sup> in einem späten Stadium (Abb.19).

Die Grenzen der Gates für die Unterteilung in Subpopulationen und für die Apoptose-Testung wurden anhand von FMO-Kontrollen ermittelt.



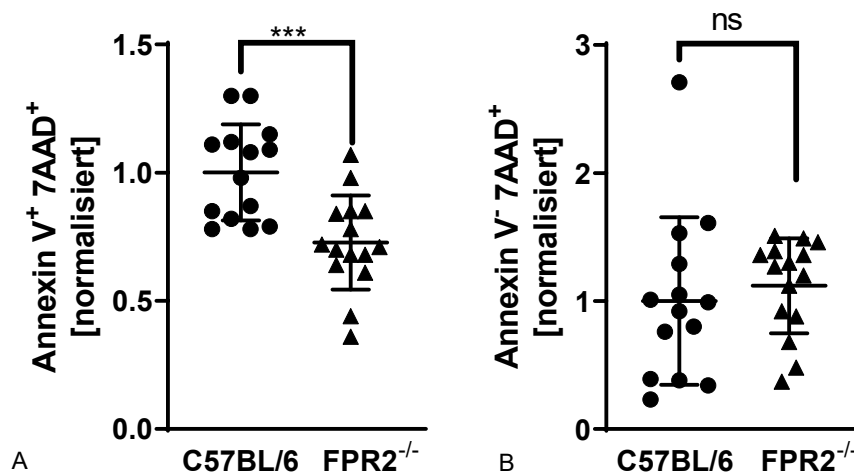
**Abbildung 20: Normalisierte Anteile an Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup> DCs und Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test. Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup> DCs:  $p=0,0378$ ; Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> DCs:  $p=0,1458$ . Die Daten wurden in 3 Versuchen erhoben.

Die Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup> DCs, die somit als lebendig definiert wurden, kumulierten bei beiden Mausstämmen um den jeweiligen Mittelwert (Abb.20A). Die Mittelwerte betragen mit bei den C57BL/6- 1,001 und bei den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen 1,093. Der prozentuale Anteil der Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup> DCs an der Gesamtzahl der DCs zeigte einen signifikanten Unterschied ( $p= 0,0378$ ) zwischen C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen. In den Splenes der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse konnten also mehr lebende DCs, die weder apoptotisch noch nekrotisch waren, beobachtet werden als in den Splenes von C57BL/6- Mäusen.

Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> DCs waren bereits in das Stadium der Apoptose eingetreten, befanden sich jedoch noch am Anfang dieses Prozesses (Abb.20B). Die normalisierten Werte dieser DCs in „früher Apoptose“ bei den C57BL/6 und bei den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten im Streudiagramm eine leichte Tendenz von weniger frühapoptotischen DCs in den Splenes von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.

Der normalisierte Mittelwert der C57BL/6 Mäuse betrug 1,000. Der Mittelwert der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse betrug 0,9133. Die statistische Analyse der Werte ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,1458$ ). Beide Mauslinien zeigten also

vergleichbare Zahlen an DCs, die sich noch im frühen Stadium der Apoptose befanden.

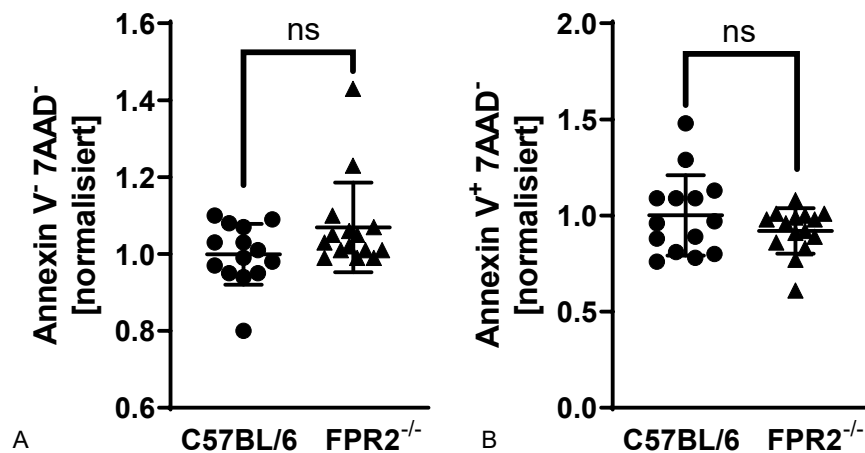


**Abbildung 21: Normalisierte Anteile an Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup> DCs und Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>+</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test. Annexin V<sup>+</sup> 7AAD<sup>+</sup> DCs:  $p=0,0005$ ; Annexin V<sup>-</sup> 7AAD<sup>+</sup> DCs:  $p=0,5490$ . Die Daten wurden in 3 Versuchen erhoben.

Annexin V<sup>+</sup> 7AAD<sup>+</sup> DCs befanden sich bereits in einem späten Stadium der Apoptose. Der Anteil spät-apoptotischer DCs stellte sich im Streudiagramm bei den C57BL/6- höher als bei den FPR2-Mäusen dar (Abb.21A). Die normalisierten Mittelwerte zeigten mit 1,001 (C57BL/6) und 0,7273 (FPR2<sup>-/-</sup>) eine Differenz, die in der statistischen Analyse signifikant war ( $p= 0,0005$ ). In der Milz der C57BL/6-Mäuse zeigten sich also mehr spät-apoptotische DCs als in der Milz der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse.

Der Anteil von Annexin V<sup>-</sup> 7AAD<sup>+</sup> DCs und somit nekrotischen Zellen zeigte sich bei beiden Mauspopulationen ähnlich bis auf eine C57BL/6-Maus, deren normalisierter Wert höher als 2,0 ausfiel (Abb.21B). Der normalisierte Mittelwert lag bei den C57BL/6-Mäusen bei 1,001 und unter den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen bei 1,119. Zwischen den unterschiedlichen Mäusen bestand in Bezug auf den Anteil der nekrotischen DCs kein signifikanter Unterschied ( $p= 0,5490$ ). Es wurde also kein Unterschied zwischen den beiden Mauslinien in Bezug auf die nekrotischen Zellen festgestellt.

Im weiteren Experiment wurden DC-Subpopulationen in den Splenes der Mäuse auf ihren Anteil an apoptotischer Zellen untersucht.

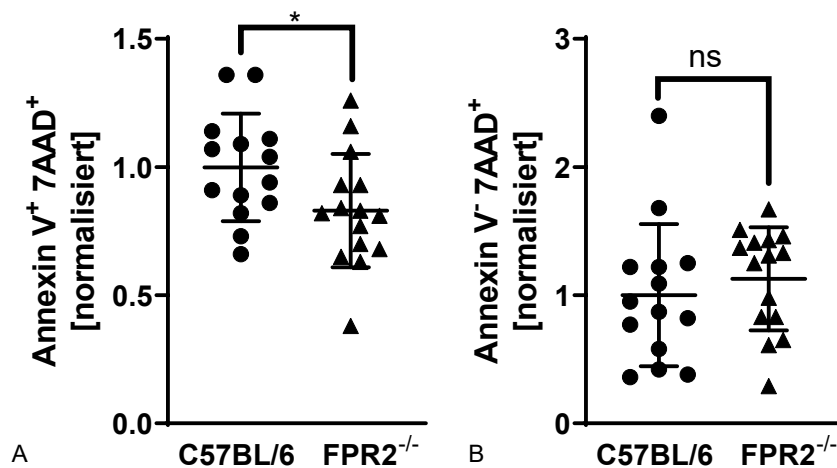


**Abbildung 22: Normalisierte Anteile an Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> DCs und Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test. Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> DCs:  $p=0,0714$ ; Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> DCs:  $p=0,2025$ . Die Daten wurden in 3 Versuchen erhoben.

Der Anteil von Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup> und somit lebenden CD4<sup>+</sup> DCs war in beiden Mauspopulationen ähnlich ausgeprägt (Abb.22A). Zwar war die Tendenz eines höheren Anteils an lebenden CD4<sup>+</sup> DCs in FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen vorhanden und die Mittelwerte von C57BL/6- (0,9993) und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen (1,069) zeigten eine Differenz. Die Unterschiede erreichten jedoch keine signifikante Ausprägung ( $p=0,0714$ ). Weder die C57BL/6- noch die FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten also mehr lebende CD4<sup>+</sup> DCs in ihrem Milzgewebe.

Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> DCs zeigten kaum Unterschiede zwischen beiden Mauspopulationen (Abb.22B). Die Anteile frühapoptotischer Zellen schienen zwar in den Splenes der C57BL/6- höher (Mittelwert: 1,001) als in den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen (Mittelwert:0,9200) zu sein, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ( $p=0,2025$ ). Keine der beiden Mauslinien zeigte also höhere Zahlen an CD4<sup>+</sup> DCs im frühen Stadium der Apoptose.

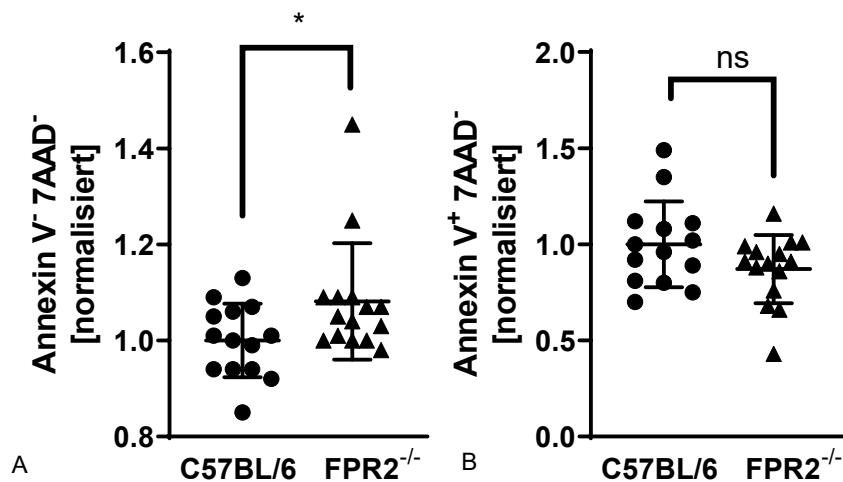




**Abbildung 23: Normalisierte Anteile an Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> DCs und Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test. Annexin V<sup>+</sup> 7AAD<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> DCs:  $p=0,0448$ ; Annexin V<sup>-</sup> 7AAD<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> DCs:  $p=0,4810$ . Die Daten wurden in 3 Versuchen erhoben.

Annexin V<sup>+</sup> 7AAD<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> DCs, die sich bereits in einem späten Stadium der Apoptose befinden, zeigten einen höheren Anteil unter den DCs der C57BL/6- als unter denen der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse (Abb.23A). Die Mittelwerte liegen bei 0,9986 (C57BL/6) und 0,8300 (FPR2<sup>-/-</sup>). Die statistische Analyse bestätigt die Unterschiede als signifikant ( $p=0,0448$ ). Die C57BL/6-Mäuse zeigten also höhere Anteile an CD4<sup>+</sup> DCs in einem späten Stadium der Apoptose.

Der Anteil nekrotischer Annexin V<sup>-</sup> 7AAD<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> DCs zeigte zwischen beiden Mausstämmen nur geringe Unterschiede (Abb.23B). Die jeweiligen Mittelwerte der normalisierten Anteilswerte boten mit 1,001 (C57BL/6) und 1,129 (FPR2<sup>-/-</sup>) nur wenig Differenz, welche sich in der statistischen Analyse als nicht signifikant bestätigte ( $p=0,4810$ ). Es wurde also kein Unterschied im Anteil an nekrotischen CD4<sup>+</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen entdeckt.

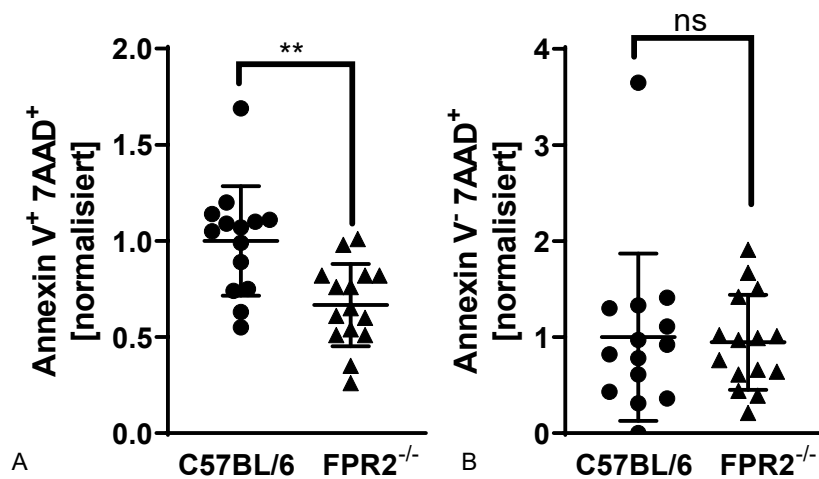


**Abbildung 24: Normalisierte Anteile an Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> DCs und Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup> -Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test. Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> DCs:  $p=0,0412$ ; Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> DCs:  $p=0,0958$ . Die Daten wurden in 3 Versuchen erhoben.

Die Anteile der apoptotischen Zellen in der CD8<sup>+</sup> DCs Subpopulation wurden ebenfalls untersucht.

Die lebenden Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> DCs zeigten in ihrem Anteil eine Differenz zwischen den beiden Mausstämmen (Abb.24A). Der Anteil der lebenden CD8<sup>+</sup> DCs zeigte sich im Vergleich bei den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen (normalisierter Mittelwert: 1,081) höher als bei den C57BL/6- Mäusen (normalisierter Mittelwert: 1,000). Die Differenz zwischen den Anteilen an lebenden CD8<sup>+</sup> DCs in beiden Mausstämmen zeigte sich in der statistischen Analyse als signifikant ( $p=0,0412$ ). Die FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten in ihrer Milz also einen höheren Anteil an lebenden CD8<sup>+</sup> DCs als die C57BL/6-Mäuse.

In den Anteilen der Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> DCs, die sich im frühen Stadium der Apoptose befinden, schien eine Tendenz mit höheren Werten bei den C57BL/6-Mäusen vorzuliegen (Abb.24B). Die normalisierten Mittelwerte zeigten mit 1,000 bei den C57BL/6- und 0,8394 bei den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen eine Differenz von 0,1606. Dieser Unterschied erreichte in der statistischen Analyse jedoch keine Signifikanz ( $p=0,0958$ ). Keine der beiden Mauslinien verfügte also über einen höheren Anteil an CD8<sup>+</sup> DCs im frühen Stadium der Apoptose.

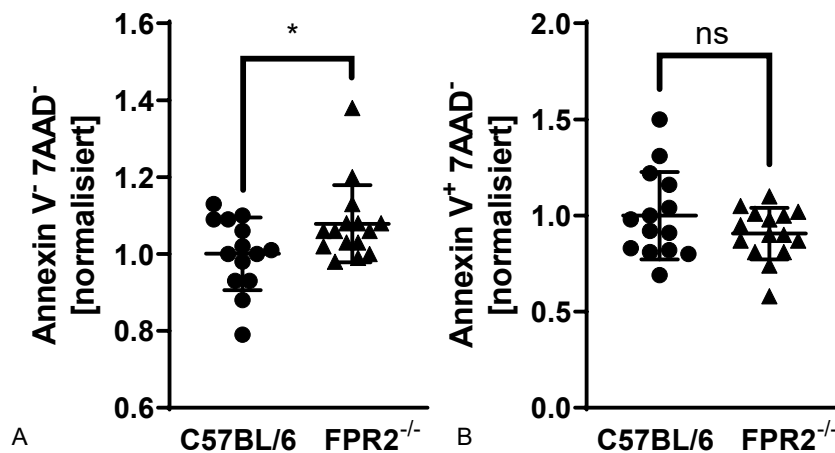


**Abbildung 25: Normalisierte Anteile an Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> DCs und Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test. Annexin V<sup>+</sup> 7AAD<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> DCs:  $p = 0,0013$ ; Annexin V<sup>-</sup> 7AAD<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> DCs:  $p = 0,8394$ . Die Daten wurden in 3 Versuchen erhoben.

Annexin V<sup>+</sup> 7AAD<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> DCs, die sich bereits in fortgeschrittenen Stadien der Apoptose befanden, wurden im Weiteren auf ihren Anteil an der Subpopulation beider Mausstämmen überprüft. Bei den beiden Mausstämmen zeigte sich hierbei eine deutliche Differenz mit höheren Anteilen an apoptotischen Zellen in der Subpopulation der C57BL/6-Mäusen (Abb.25A). Die normalisierten Mittelwerte unterschieden sich mit 1,000 (C57BL/6) und 0,6667 (FPR2<sup>-/-</sup>) ebenfalls. Die Unterschiede zeigten sich in der statistischen Analyse als signifikant ( $p = 0,0013$ ). Die FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten also einen geringeren Anteil an milzständigen CD8<sup>+</sup> DCs im späten Stadium der Apoptose als die C57BL/6-Mäuse.

Die nekrotischen Annexin V<sup>-</sup> 7AAD<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> DCs zeigten sich in beiden Mausstämmen ähnlich anteilig in der Subpopulation und im Streudiagramm annähernd gleich verteilt zwischen 0 und 2,00, bis auf einen Ausreißer unter den C57BL/6-Mäusen, dessen normalisierter Anteil an nekrotischen Zellen bei 3,65 lag (Abb.25B). Die normalisierten Mittelwerte zeigen mit 1,000 (C57BL/6) und 0,9467 (FPR2<sup>-/-</sup>) eine leichte Differenz, die aber nicht signifikant ausfällt ( $p = 0,8394$ ). Es konnte also kein Unterschied im Anteil an nekrotischen CD8<sup>+</sup> DCs in der Milz von FPR2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6-Mäusen festgestellt werden.

Des Weiteren wurden die Anteile von apoptotischen und nekrotischen DCs in der Subpopulation der CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs untersucht.

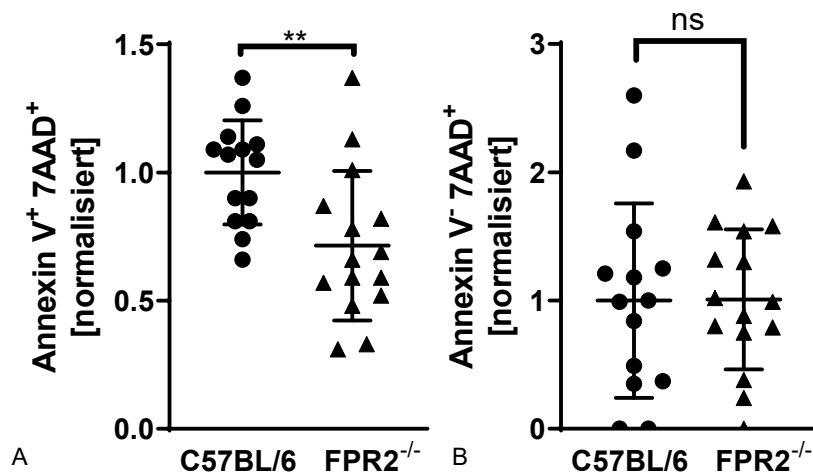


**Abbildung 26: Normalisierte Anteile an Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs und Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs in der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test. Annexin V<sup>-</sup> 7AAD<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs:  $p=0,0407$ ; Annexin V<sup>+</sup> 7AAD<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs:  $p=0,1859$ . Die Daten wurden in 3 Versuchen erhoben.

Die lebenden Annexin V<sup>-</sup> 7AAD<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs zeigten eine Differenz mit höheren Anteilen unter den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb.26A). Die jeweiligen Anteile lebender CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs kumulierten bei beiden Mausstämmen hauptsächlich nah um die jeweiligen Mittelwerte 1,001 (C57BL/6) und 1,079 (FPR2<sup>-/-</sup>). Bei den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte sich ein höherer Ausreißer mit einem normalisierten Wert von 1,38. Bei den C57BL/6-Mäusen zeigte sich ein niedriger Ausreißer mit einem normalisierten Wert von 0,79. Die höheren Anteile lebender CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs in der Milz von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen stellte sich als signifikant heraus ( $p=0,0407$ ). Die FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten also einen höheren Anteil lebender CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs als die C57BL/6-Mäuse.

In der Analyse der Annexin V<sup>+</sup> 7AAD<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs zeigten sich im Streudiagramm eine annähernd gleiche Verteilung bei C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb.26B). Die normalisierten Anteile an frühen apoptotischen CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs beider Mauslinien bewegten sich zwischen 0,5 und 1,5. Die Mittelwerte zeigten zwar mit 0,9993 (C57BL/6) und 0,9060 (FPR2<sup>-/-</sup>) eine

Differenz. Diese Differenz erreichte aber keine signifikante Ausprägung ( $p=0,1859$ ). Es wurde also kein Unterschied im Anteil von  $CD4^- CD8^-$  DCs im frühen Stadium der Apoptose zwischen C57BL/6- und  $FPR2^{-/-}$ -Mäusen festgestellt.



**Abbildung 27: Normalisierte Anteile an Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>  $CD4^- CD8^-$  DCs und Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>+</sup>  $CD4^- CD8^-$  DCs in der Milz von C57BL/6- und  $FPR2^{-/-}$ -Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test. Annexin V<sup>+</sup> 7AAD<sup>+</sup>  $CD4^- CD8^-$  DCs:  $p=0,0052$ ; Annexin V<sup>-</sup> 7AAD<sup>+</sup>  $CD4^- CD8^-$  DCs:  $p=0,9696$ . Die Daten wurden in 3 Versuchen erhoben.

Annexin V<sup>+</sup> 7AAD<sup>+</sup>  $CD4^- CD8^-$  DCs in einem fortgeschrittenen Stadium der Apoptose, zeigten in beiden Mausstämmen eine Differenz der Werte (Abb.27A). Die Anteile dieser spät apoptotischen  $CD4^- CD8^-$  DCs an der gesamten Subpopulationen fielen insgesamt bei den  $FPR2^{-/-}$ -Mäusen geringer aus. Auch wenn die Anteile eine große Streuung unter den Mäusen zeigten, konnte doch anhand der Mittelwerte (C57BL/6: 1,000;  $FPR2^{-/-}$ : 0,7147) von deutlichen Unterschieden gesprochen werden. Die statistische Analyse bestätigte die Anteile der Annexin V<sup>+</sup> 7AAD<sup>+</sup>  $CD4^- CD8^-$  DCs in der Milz von  $FPR2^{-/-}$ -Mäusen als signifikant niedriger ( $p=0,0052$ ).

Die apoptotischen  $CD4^- CD8^-$  DCs waren also in der Milz von  $FPR2^{-/-}$ - Mäusen in geringerem Maße vorhanden als in der Milz von C57BL/6-Mäusen (Abb.27B).

Die nekrotischen Annexin V<sup>-</sup> 7AAD<sup>+</sup>  $CD4^- CD8^-$  DCs zeigten in ihren Anteilen an der Subpopulation bei beiden Mäusen eine große Variabilität. Zudem waren sie

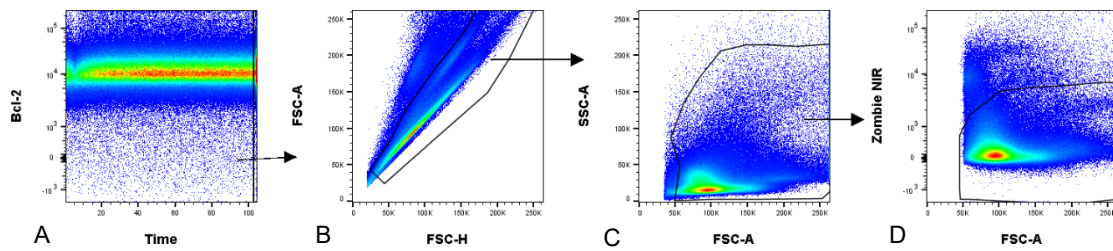
in ihrer Verteilung bei den Mäusen beider Stämme im Streudiagramm sehr ähnlich.

Dies schlug sich ebenfalls in den Mittelwerten von 0,9993 (C57BL/6) und 1,009 (FPR2<sup>-/-</sup>) nieder. Eine gleichwertige Aussage traf auch die statistische Analyse der Daten ( $p=0,9696$ ). Es konnte also kein Unterschied zwischen C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen bezüglich der Anteile von nekrotischen CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs in der Milz festgestellt werden.

In diesen Versuchen konnte also gezeigt werden, dass die prozentualen Anteile von DCs in verschiedenen Stadien des Lebenszyklus einer Zelle vom FPR2 beeinflusst werden. Möglicherweise beeinflusst der FPR2 also die Apoptose Neigung der DCs in der Milz. Und führt möglicherweise zu einem besseren Überleben der DCs.

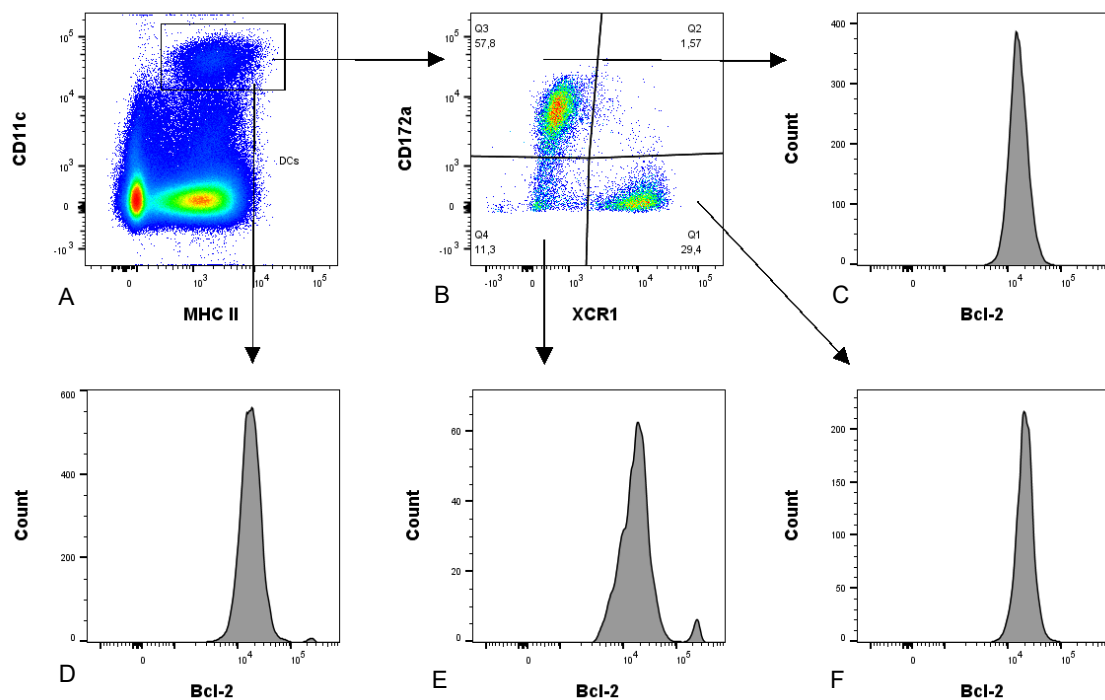
### 3.4 Der FPR2 zeigt einen Einfluss auf die intrazelluläre Menge von Bcl-2

Um die Hypothese, dass das bessere Überleben der FPR2<sup>-/-</sup>-DCs durch eine Veränderung im Apoptose-Ablauf bedingt ist, zu untersuchen, wurde die Konzentration des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 in den DCs durchflusszytometrisch analysiert. Hierzu wurden die DCs aus den Splenes von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert. Neben den fluoreszenzmarkierten Antikörpern für Oberflächenantigene wurden die DCs zusätzlich mit einem intrazellulären Antikörper für Bcl-2 angefärbt. Die fluorochromgefärbten Zellen wurden anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Proben wurde für jede Probe der Median der Bcl-2-Konzentration erhoben. Diese Werte wurden anschließend mit dem Mittelwert der C57BL/6- Mäuse normalisiert.



**Abbildung 28: Gating-Strategie zur Unterscheidung der Zielzellen von membranösen Debris und anderen Zellen der Milz. (A) „Timegate“, (B) Einzelzellen, (C) Immunzellen, (D) lebende Zellen**

Wie in vorherigen Versuchen wurden mögliche Unregelmäßigkeiten während der Analyse, Zeldupletten, Erythrozyten, Debris und tote Zellen mithilfe einer Gating-Strategie von Immunzellen diskriminiert (Abb. 28). Die Gating-Strategie hierfür entsprach dem Vorgehen bei der Analyse der DC-Subpopulation in der Milz (s. Kapitel 3.2).

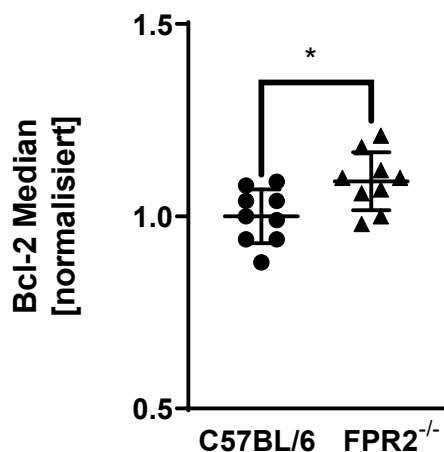


**Abbildung 29: Gating-Strategie zur Identifizierung von DCs und DC-Subpopulationen sowie zur Ermittlung des intrazellulären Medians von Bcl-2: (A) DCs (CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>), (B) CD172a<sup>+</sup> XCR1<sup>-</sup> DCs (Q1); CD172a<sup>-</sup> XCR1<sup>+</sup> DCs (Q3); CD172a<sup>-</sup> XCR1<sup>-</sup> DCs (Q4), (C) intrazelluläre Menge von Bcl-2 in CD172a<sup>+</sup> XCR1<sup>-</sup> DCs, (D) intrazelluläre Menge von Bcl-2 in DCs, (E) in CD172a<sup>-</sup> XCR1<sup>-</sup> DCs und (F) in CD172a<sup>-</sup> XCR1<sup>+</sup> DCs.**

Alle lebenden Zellen wurden nun in einem Pseudocolor-Diagramm mit CD11c auf der Ordinate und MHC II auf der Abszisse aufgetragen. Die CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>

Zellen wurden als DCs identifiziert (Abb.29A). Die Population der DCs wurde auf ihre Ausprägung von CD172a und XCR1 analysiert um die Subpopulationen XCR1<sup>+</sup> CD172a<sup>-</sup> DCs (entsprechen CD8<sup>+</sup> DCs) und XCR1<sup>-</sup> CD172a<sup>+</sup> DCs (entsprechen CD4<sup>+</sup> DCs) zu identifizieren. Ebenso konnten so XCR1<sup>-</sup> CD172a<sup>-</sup> DCs (entsprechen CD8<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> DCs) ermittelt werden (Abb.29B). Die Gates zur Abgrenzung der Subpopulationen wurden mithilfe von FMO-Kontrollen festgelegt.

Die Population der DCs sowie die Subpopulationen der XCR1<sup>+</sup> DCs, CD172a<sup>+</sup> DCs und XCR1<sup>-</sup> CD172a<sup>-</sup> DCs wurden nun in Bezug auf die Konzentration des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 untersucht (Abb.29C-F)).



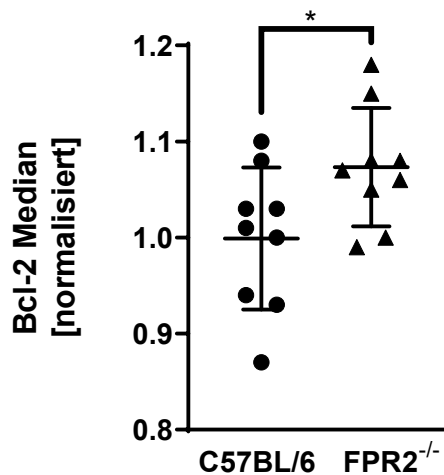
**Abbildung 30: Normalisierte Mediane von Bcl-2 in den DCs der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test ( $p= 0,0171$ ). Die Daten wurden in 2 Versuchen erhoben.

Im Vergleich der DCs beider Mausstämmen fielen unter den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen höhere Konzentrationen des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 als bei den C57BL/6-Mäusen auf, so reichten die normalisierten Werte der C57BL/6-Mäuse von 0,88 bis 1,09 (Abb.30). Die normalisierten Werte der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse gruppierten sich in einem Bereich von 0,98 bis 1,21. Die Mittelwerte beider Mausstämmen unterschieden sich mit 1,000 (C57BL/6) und 1,091 (FPR2<sup>-/-</sup>). Die statistische Analyse ergab, dass die DCs in der Milz der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse eine



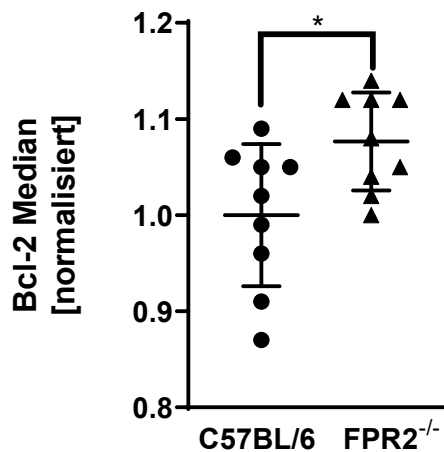
signifikant ( $p= 0,0171$ ) höhere Konzentration von Bcl-2 zeigten als die DCs der C57BL/6-Mäuse.

Im Weiteren wurden die Subpopulationen der DCs in der Milz untersucht. Die FPR2<sup>-/-</sup>-DCs verfügten also über höhere Bcl-2 Mediane als die C57BL/6-DCs.



**Abbildung 31: Normalisierte Mediane von Bcl-2 in den CD172a<sup>+</sup> DCs der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test ( $p=0,0338$ ). Die Daten wurden in 2 Versuchen erhoben.

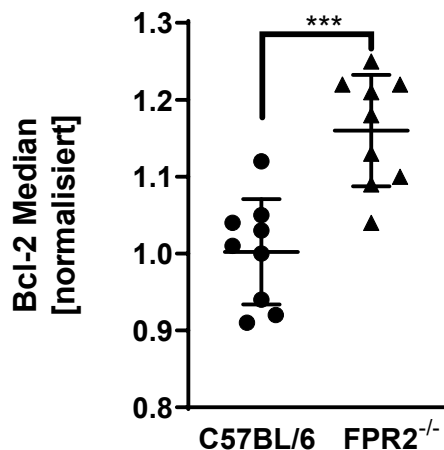
Im Vergleich der Konzentration von Bcl-2 in der CD172a<sup>+</sup> DCs Subpopulation bei C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten sich höhere Mediane bei den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb.31). Die normalisierten Werte der Bcl-2-Konzentration in C57BL/6-CD172a<sup>+</sup> DCs reichte von 0,87 bis 1,10, die der FPR2<sup>-/-</sup>-CD172a<sup>+</sup> DCs von 0,99 bis 1,18 Die normalisierten Mittelwerte zeigten mit 0,9989 (C57BL/6) und 1,073 (FPR2<sup>-/-</sup>) eine Differenz von 0,0741. Die statistische Analyse bestätigte die höheren Konzentrationen von Bcl-2 in FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen als signifikant ( $p=0,0338$ ). Die FPR2<sup>-/-</sup>-CD172a<sup>+</sup> DCs verfügten also über eine höhere intrazelluläre Konzentration des anti-apoptischen Proteins Bcl-2.



**Abbildung 32: Normalisierte Mediane von Bcl-2 in den XCR1<sup>+</sup> DCs der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test ( $p=0,0210$ ). Die Daten wurden in 2 Versuchen erhoben.

In der Subpopulation der XCR1<sup>+</sup> DCs zeigten sich ebenfalls höhere Mediane der Bcl-2 Konzentration in den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb.32). Die normalisierten Werte der C57BL/6- XCR1<sup>+</sup> DCs erstreckten sich von 0,87 bis 1,09, die Werte der FPR2<sup>-/-</sup>- XCR1<sup>+</sup> DCs dagegen von 1,02 bis 1,14.

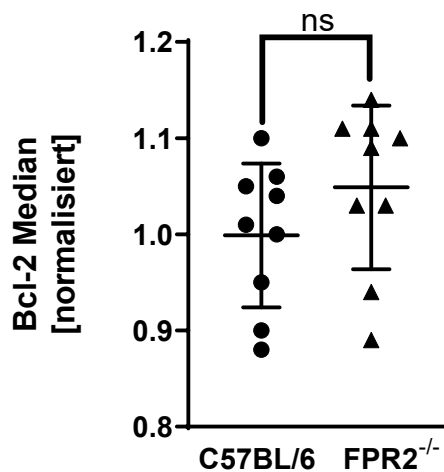
Die Mittelwerte der Mediane von FPR2<sup>-/-</sup> (1,077) und C57BL/6-Mäusen (1,000) zeigten ebenfalls eine Differenz von 0,077. In der statistischen Analyse wurden die Konzentration von Bcl-2 in den XCR1<sup>+</sup> DCs von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen als signifikant höher verifiziert ( $p=0,0210$ ).



**Abbildung 33: Normalisierte Mediane von Bcl-2 in den dnDCs der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test ( $p=0,0002$ ). Die Daten wurden in 2 Versuchen erhoben.

Unter den XCR1<sup>-</sup> CD172a<sup>-</sup> DCs zeigte sich ebenfalls ein Unterschied der Bcl-2 Mediane zwischen C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb.33).

Das Streudiagramm zeigt höhere Mediane der Bcl-2 Konzentration in den XCR1<sup>-</sup> CD172a<sup>-</sup> DCs der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen als in denen der C57BL/6-Mäuse, diese reichten bei den C57BL/6-XCR1<sup>-</sup> CD172a<sup>-</sup> DCs von 0,91 bis 1,12 und bei den FPR2<sup>-/-</sup>-XCR1<sup>-</sup> CD172a<sup>-</sup> DCs von 1,04 bis 1,25. Die Mittelwerte bilden ebenfalls mit 1,002 (C57BL/6) und 1,160 (FPR2<sup>-/-</sup>) eine Differenz von 0,58 ab. Die statistische Analyse bestätigte die Bcl-2 Konzentration der FPR2<sup>-/-</sup>-XCR1<sup>-</sup> CD172a<sup>-</sup> DCs als signifikant höher ( $p=0,0002$ ). Die XCR1<sup>-</sup> CD172a<sup>-</sup> DCs der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse verfügten ebenfalls über höhere intrazelluläre Konzentrationen an Bcl-2 als die C57BL/6-XCR1<sup>-</sup> CD172a<sup>-</sup> DCs.



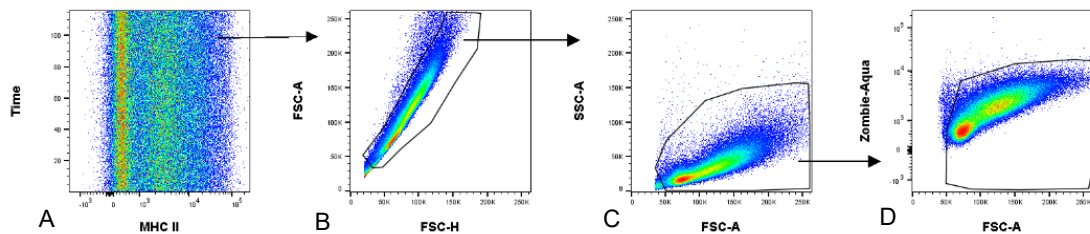
**Abbildung 34: Normalisierte Mediane von Bcl-2 in den „nicht“-DCs der Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem Students t-Test ( $p=0,2039$ ). Die Daten wurden in 2 Versuchen erhoben.

Zur Kontrolle, ob dies ein auf die DCs beschränkter Effekt ist, wurden ebenfalls die Zellen der Splenes untersucht, welche nicht zu den DCs gehören. Alle CD11c<sup>-</sup> MHC II<sup>-</sup> und CD11c<sup>-</sup> MHC II<sup>+</sup> Zellen der Milz wurden dafür ebenfalls auf die Mediane der Bcl-2 Konzentration untersucht. Hierbei konnte kein Unterschied gezeigt werden. Zwar hätte eine gewisse Tendenz von höheren Konzentrationen von Bcl-2 in den Zellen der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse (normalisierter Mittelwert:1,049) als in denen der C57BL/6-Mäusen (normalisierter Mittelwert:0,9989) vorliegen können (Abb.34), jedoch erreichte dieser Unterschied in der statistischen Analyse keine signifikanten Ausmaße ( $p=0,2039$ ). Zellen von C57BL/6- und Fpr2<sup>-/-</sup>-Mäusen, die nicht die Identifikationskriterien für Dendritische Zellen erfüllten, zeigten also keinen Unterschied bezüglich der intrazellulären Konzentration von Bcl-2.

### 3.5 Der FPR2 hat keinen Einfluss auf den Reifeprozess von Dendritischen Zellen

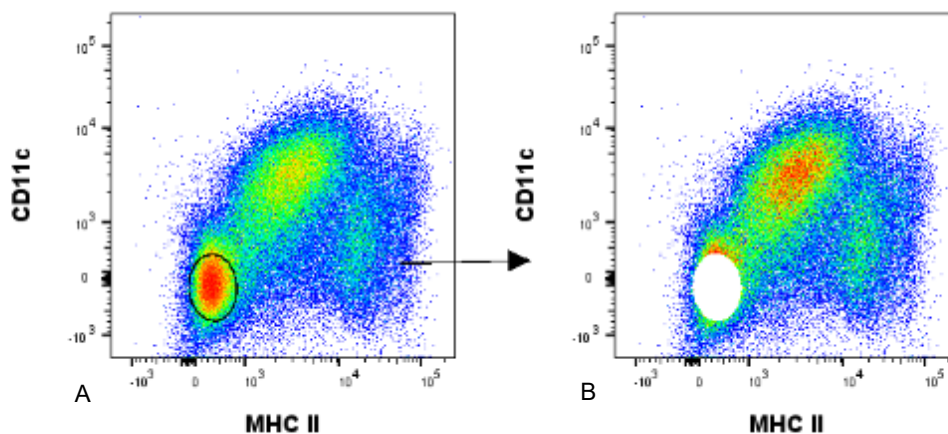
Der FPR2 schien in vorherigen Versuchen unserer Arbeitsgruppe Einfluss auf die Zahl von DCs in Knochen und Milz zu haben. Zur Klärung, ob der FPR2 den Reifeprozess von Dendritischen Zellen beeinflusst, wurde untersucht wie DCs

von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen in der Zellkultur heranreifen und wie sie auf als fremd erkannte Antigene, die einen Maturationsprozess einleiten, reagieren. Hierzu wurden Knochenmarkszellen von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert und anschließend 8 Tage in Nährmedium und mit GM-CSF bei 37°C zu DCs differenziert.



**Abbildung 35: Gating-Strategie zur Unterscheidung der Zielzellen von membranösen Debris und anderen Zellen bzw. nicht gereiften Zellen. (A) „Timegate“, (B) Einzelzellen, (C) Immunzellen, (D) lebende Zellen**

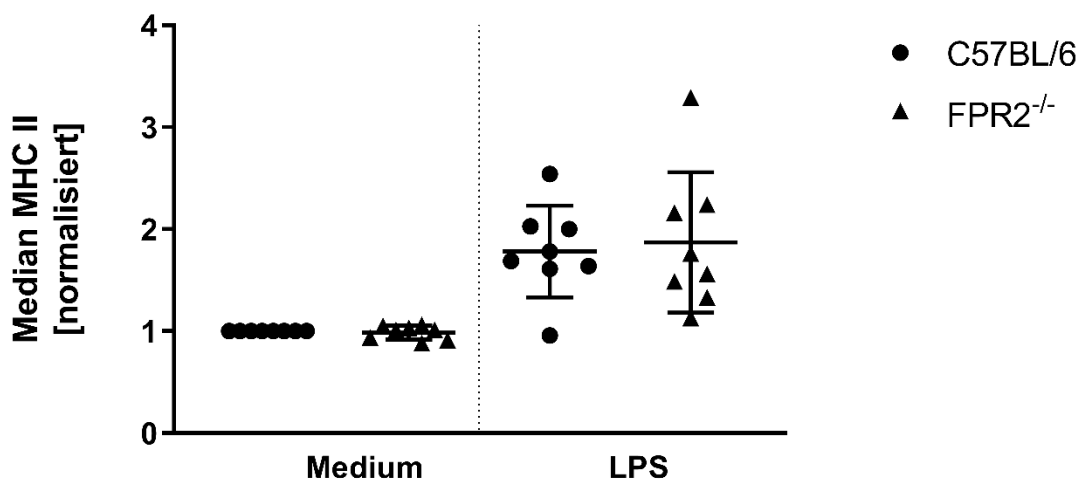
Zur Verbesserung des Versuchsergebnisses, wurden mögliche Unregelmäßigkeiten während der Analyse, Zelldupletten, Debris und tote Zellen mithilfe einer Gating-Strategie von BMDCs diskriminiert (Abb.35). Die Gating-Strategie hierfür entsprach dem Vorgehen bei der Analyse der DC-Vorläufer im Knochenmark (s. Kapitel 3.1).



**Abbildung 36: Gating-Strategie zur Unterscheidung der maturierten BMDCs von nicht gereiften und anderen Zellen.**

Alle lebenden Zellen wurden im Anschluss in ein Diagramm mit CD11c auf der Ordinate und MHC II auf der Abszisse übertragen (Abb.36A). Um die mithilfe von

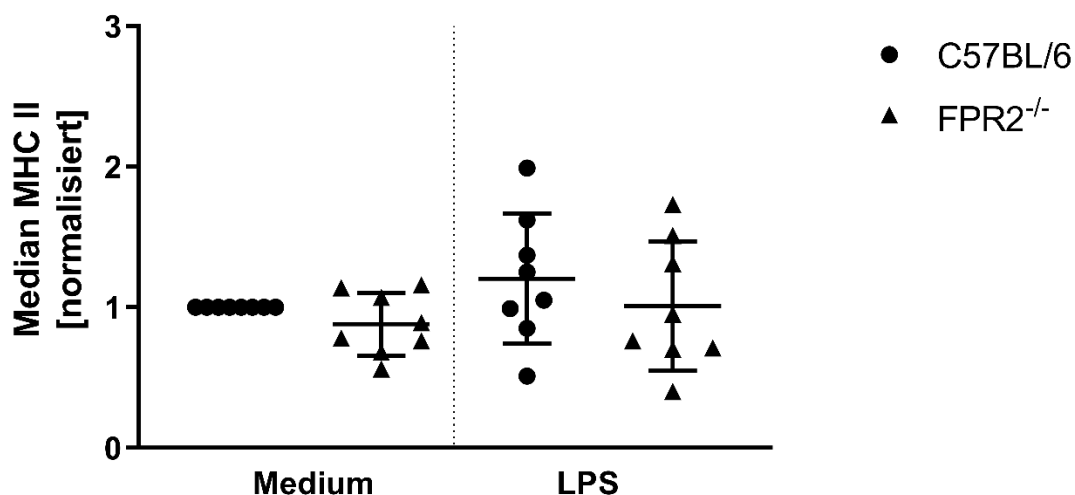
GM-CSF generierten BMDCs von anderen Zellen in Kultur zu unterscheiden, wurden die lebenden Zellen in einem Pseudocolor-Diagramm in Bezug auf ihre Ausprägung von CD11c und MHC II aufgetragen. Es wurde ein sogenanntes „Not“-Gate um alle CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> Zellen gezogen, um diese von der weiteren Analyse auszuschließen (Abb.36B). Die verbliebenen BMDCs wurden nun auf ihre Ausprägung der Oberflächenantigene CD40, CD54, CD80 und CD86 untersucht. Für jedes untersuchte Oberflächenantigen wurde pro Replikat der Median erhoben. Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den Versuchen wurden die Ergebnisse normalisiert.



**Abbildung 37: Normalisierte Mediane von MHC II auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne und nach 6 h Stimulation mit LPS.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-way ANOVA mit Šidáks multiple comparisons Test. C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide nicht stimuliert:  $p=0,9695$ ; C57BL/6 nicht stimuliert vs. C57BL/6 6 h LPS:  $p=0,0069$ ; FPR2<sup>-/-</sup> nicht stimuliert vs. FPR2<sup>-/-</sup> 6 h LPS:  $p=0,0278$ ; C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide 6 h LPS:  $p=0,9983$ . Die Daten wurden in 8 Versuchen erhoben.

Die Untersuchung des Oberflächenproteins MHC II, zeigte einen Anstieg der Expression nach 6 h LPS-Stimulation (Abb.37). Der Mittelwert der normalisierten Mediane von MHC II auf der Zelloberfläche von nicht stimulierten FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs betrug 0,9863. Er zeigte sich also im Vergleich zu dem Mittelwert der Mediane von C57BL/6-BMDCs (1,00) etwas niedriger. Dieser Unterschied in der Ausprägung von MHC II auf der Oberfläche von nicht stimulierten von C57BL/6-

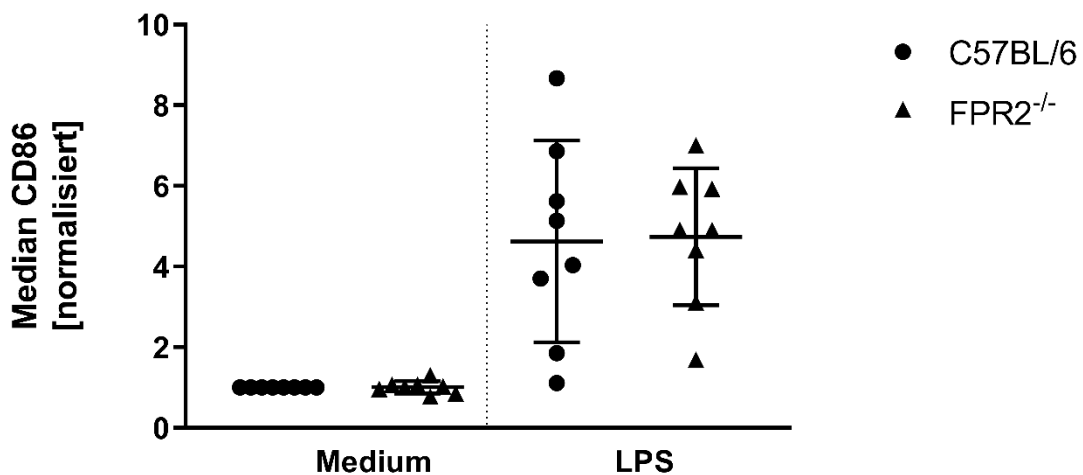
und FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs erreichte aber keine signifikanten Ausmaße (p=0,9695). Nach 6 h Stimulation mit LPS zeigten die C57BL/6- (Mittelwert: 1,781) eine ähnlich veränderte Ausprägung von MHC II wie die FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs (Mittelwert: 1,870) (Abb.37). In der statistischen Analyse zeigte der Unterschied der Ausprägung von MHC II nach 6 h Stimulation zwischen C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs keine signifikanten Ausmaße (p=0,9983). Im Vergleich der nicht stimulierten und 6 h mit LPS stimulierten Ansätze wurde sowohl bei den C57BL/6- (p=0,0069) als auch bei den FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs (p=0,0278) ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Ausprägung von MHC II gefunden. Nach 6 h Stimulation mit LPS zeigten also die BMDCs beider Mauslinien keine unterschiedliche Reaktion in ihrer Expression von MHC II. Auch die nicht stimulierten BMDCs zeigten nach 8 Tagen Reifung keine Unterschiede in ihrer Expression von MHC II.



**Abbildung 38: Normalisierte Mediane von MHC II auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne und nach 24 h Stimulation mit LPS.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-way ANOVA mit Šidáks multiple comparisons Test. C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide nicht stimuliert: p=0,5306; C57BL/6 nicht stimuliert vs. C57BL/6 24 h LPS: p=0,6883; FPR2<sup>-/-</sup> nicht stimuliert vs. FPR2<sup>-/-</sup> 24 h LPS: p=0,9304; C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide 24 h LPS: p=0,4326. Die Daten wurden in 8 Versuchen erhoben.

In den 24 h inkubierten Ansätzen zeigten die nicht stimulierten Kontrollen eine Tendenz zu einer geringeren Ausprägung von MHC II auf der Oberfläche von FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs (Abb.38). Dies fiel ebenfalls beim Vergleich der normalisierten Mittelwerte der MHC II Mediane auf. Hier war der Mittelwert der FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs mit 0,88 etwas geringer als der von C57BL/6-BMDCs mit 1,00. Dieser Unterschied zwischen den nicht stimulierten Kontrollen war nicht signifikanten Ausmaßes in der statistischen Analyse ( $p=0,5306$ ). Nach 24 h der Stimulation mit LPS konnte sowohl bei C57BL/6- als auch bei FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen eine Änderung der MHC II auf der Oberfläche der BMDCs gezeigt werden (Abb.38). Sowohl die C57BL/6- als auch die FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs zeigten eine geringfügig erhöhte Expression von MHC II. Die C57BL/6-BMDCs zeigten dabei eine etwas größere Zunahme der Expression, mit einem normalisierten Mittelwert von 1,204, als die FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs mit einem Mittelwert von 1,009. Dieser Unterschied zwischen der MHC II Expression auf der Oberfläche der C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs nach 24 h LPS-Stimulation zeigte in der statistischen Analyse keine signifikanten Ausmaße ( $p=0,4326$ ). Ebenfalls zeigten die nicht stimulierten Ansätze im Vergleich der 24 h mit LPS stimulierten innerhalb der jeweiligen Mauslinien keine signifikanten Unterschiede (Abb.38). Weder bei den C57BL/6-BMDCs ( $p=0,6883$ ) noch bei den FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs ( $p=0,9304$ ). Dies stellte einen Unterschied zu den 6 h mit LPS stimulierten Ansätzen dar. Nach 24 h der Stimulation mit LPS wurde also ebenfalls keine unterschiedliche Reaktion der BMDCs beider Mauslinien in ihrer Ausprägung von MHC II nachgewiesen.



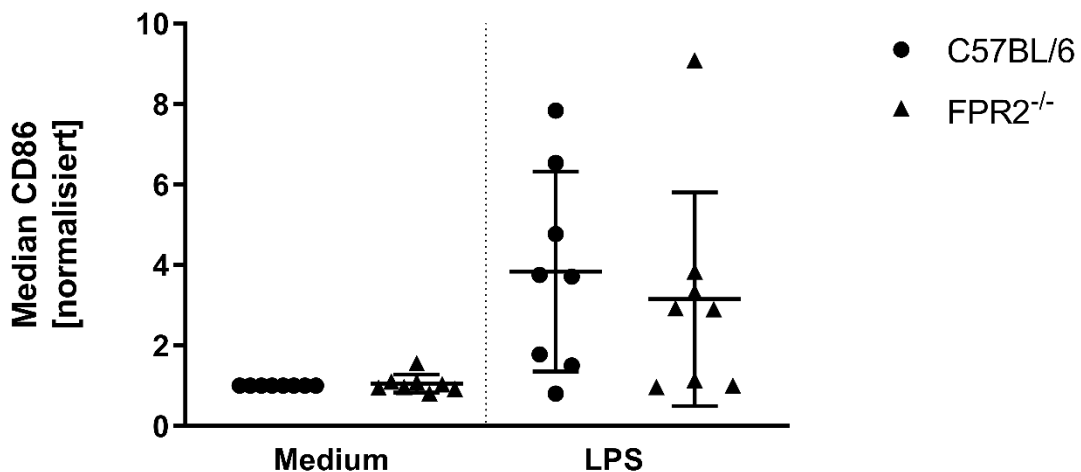


**Abbildung 39: Normalisierte Mediane von CD86 auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne und nach 6 h Stimulation mit LPS.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-way ANOVA mit Šidáks multiple comparisons Test. C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide nicht stimuliert:  $p=0,9998$ ; C57BL/6 nicht stimuliert vs. C57BL/6 6 h LPS:  $p=0,0183$ ; FPR2<sup>-/-</sup> nicht stimuliert vs. FPR2<sup>-/-</sup> 6 h LPS:  $p=0,0017$ ; C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide 6 h LPS:  $p=0,9997$ . Die Daten wurden in 8 Versuchen erhoben.

Weiterhin wurde untersucht, wie sich die Stimulation der BMDCs durch LPS auf die Expression des costimulatorischen Proteins CD86 auswirkte. Nach 6 h glichen sich die nicht stimulierten BMDCs von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen im Ausmaß ihrer Ausprägung von CD86 (Abb.39). Dies gaben auch die normalisierten Mittelwerte der CD86 Mediane wieder. Diese betragen bei den C57BL/6-Mäusen 1,000 und bei den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen 1,009. Der Unterschied zwischen beiden Mauslinien war in der statistischen Untersuchung nicht signifikant ( $p=0,9998$ ).

Die BMDCs beider Mauslinien zeigten in ähnlicher Weise eine Steigerung der CD86 Ausprägung nach 6 h Stimulation mit LPS (Abb.39). Die BMDCs der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten einen normalisierten Mittelwert von 4,741, die C57BL/6-Mäuse zeigten einen Mittelwert von 4,624. Die FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse boten in der Tendenz etwas höhere Mediane der Ausprägung von CD86 nach 6 h Stimulation mit LPS. Dieser Unterschied war in der statistischen Analyse nicht signifikant ( $p=0,9997$ ). Im Vergleich von nicht stimulierten und LPS stimulierten Ansätzen innerhalb der

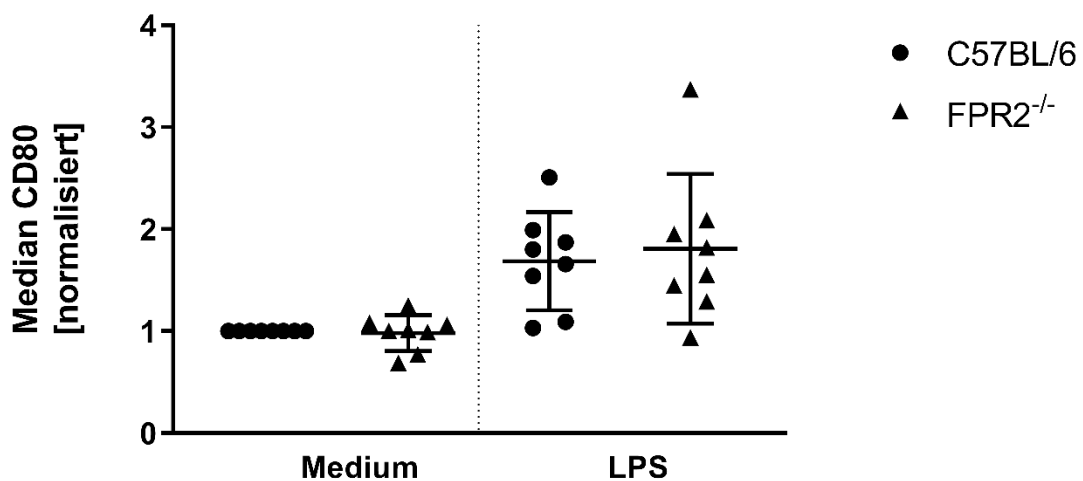
Mauslinien zeigten sich sowohl bei den BMDCs der C57BL/6- ( $p=0,0183$ ) als auch bei denen der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse ( $p=0,0017$ ) signifikant höhere Expression von CD86 auf der Oberfläche von mit LPS stimulierten BMDCs. Nach 6 h der Stimulation mit LPS zeigten die BMDCs von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen keinen Unterschied in ihrer Expression von CD86.



**Abbildung 40: Normalisierte Mediane von CD86 auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne und nach 24 h Stimulation mit LPS.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-way ANOVA mit Šidáks multiple comparisons Test. C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide nicht stimuliert:  $p=0,9433$ ; C57BL/6 nicht stimuliert vs. C57BL/6 24 h LPS:  $p=0,0565$ ; FPR2<sup>-/-</sup> nicht stimuliert vs. FPR2<sup>-/-</sup> 24 h LPS:  $p=0,2536$ ; C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide 24 h LPS:  $p=0,8549$ . Die Daten wurden in 8 Versuchen erhoben.

Nach 24 h zeigten die nicht stimulierten Ansätze ähnlich wie nach 6 h kaum einen Unterschied (Abb.40). Dies spiegelte sich auch in den normalisierten Mittelwerten wider. Diese betragen bei den C57BL/6- 1,00 und bei den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen 1,055. Die im Vergleich zu den C57BL/6- BMDCs leicht erhöhte Ausprägung von CD86 auf den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ergab in der statistischen Analyse keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,9433$ ). Die mit 24 h mit LPS stimulierten Ansätze zeigten eine Zunahme der Ausprägung von CD86 im Vergleich mit den nicht stimulierten Ansätzen (Abb.40). Auch wenn der Unterschied der normalisierten Mittelwerte nicht so groß wie in den 6 h Ansätzen war, war die Steigerung der Ausprägung gegenüber den nicht stimulierten Ansätzen deutlich. Der normalisierte Mittelwert

der C57BL/6-Mäuse zeigte mit 3,836 eine höhere Ausprägung von CD86 als die BMDCs der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse mit einem Mittelwert von 3,150. Die Mediane der CD86 Ausprägung zeigten nach 24 h Stimulation mit LPS eine recht große Streuung, sowohl bei C57BL/6- als auch bei FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb.40). Obwohl nun der Mittelwert der C57BL/6-Mäuse höher war als der Mittelwert der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse war, zeigte die statistische Analyse keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,8549$ ) zwischen beiden Mauslinien. Auch der Vergleich zwischen den stimulierten und nicht stimulierten 24 h-Ansätzen der jeweiligen Mauslinien zeigte sowohl bei C57BL/6-Mäusen ( $p=0,0565$ ), als auch bei den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $p=0,2536$ ) keine signifikanten Unterschiede, anders als bei den 6 h Ansätzen (Abb.40). Nach 24 h der LPS-Stimulation exprimierten die BMDCs von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen CD86 in vergleichbarem Ausmaß.



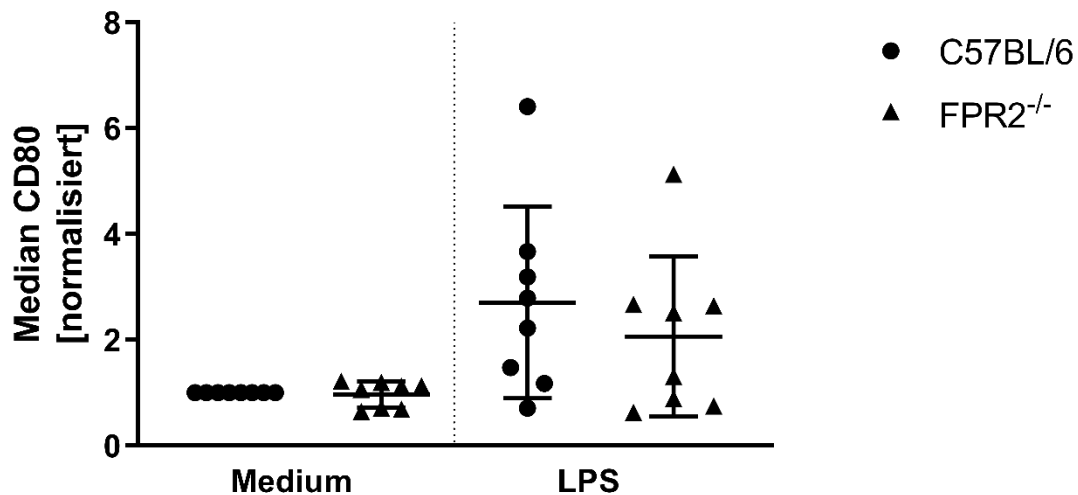
**Abbildung 41: Normalisierte Mediane von CD80 auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne und nach 6 h Stimulation mit LPS.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-way ANOVA mit Šidáks multiple comparisons Test. C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide nicht stimuliert:  $p=0,9973$ ; C57BL/6 nicht stimuliert vs. C57BL/6 6 h LPS:  $p=0,0199$ ; FPR2<sup>-/-</sup> nicht stimuliert vs. FPR2<sup>-/-</sup> 6 h LPS:  $p=0,0368$ ; C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide 6 h LPS:  $p=0,9942$ . Die Daten wurden in 8 Versuchen erhoben.

Die Ausprägung des costimulatorischen Protein CD80 zeigte eine andere Kinetik in Reaktion auf Stimulation mit LPS bei C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen als CD86.

Nach 6 h Stunden zeigten die nicht stimulierten BMDCs der C57BL/6-Mäuse eine höhere Ausprägung von CD80 als die FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse (Abb.41). Dies spiegelte sich auch in den normalisierten Mittelwerten der CD80 Mediane wider. Hier war der Mittelwert der C57BL/6-Mäuse mit 1,00 höher als der der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse mit 0,9813. Auch wenn hier also eine etwas höhere Ausprägung von CD80 auf der Oberfläche von nicht stimulierten BMDCs bei C57BL/6-Mäusen beobachtet werden konnte, so ist dieser Unterschied in der statistischen Untersuchung nicht signifikant ( $p=0,9973$ ).

Die 6 h mit LPS stimulierten Ansätze zeigten sowohl bei C57BL/6- als auch bei FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen einen Anstieg der Expression von CD80 auf der Zelloberfläche. Dabei zeigten die FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse einen größeren Anstieg als die C57BL/6-Mäuse (Abb.41). Diesen Sachverhalt spiegelten auch die normalisierten Mittelwerte der CD80-Expression von BMDCs nach 6 h LPS-Stimulation wider. Die FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse boten auch mit 1,808 einen höheren Mittelwert als die C57BL/6-Mäuse mit 1,686. Dieser Unterschied in der Ausprägung CD80 zwischen C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen erreichte in der statistischen Analyse jedoch keine Signifikanz ( $p=0,9942$ ).

Im Vergleich der CD80 Ausprägung, zwischen stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen, zeigten sowohl die BMDCs der C57BL/6-Mäuse ( $p=0,0199$ ) als auch die der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse ( $p=0,0368$ ) einen signifikanten Anstieg (Abb.41). Im Vergleich zeigten die BMDCs von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen also keinen Unterschied der Ausprägung von CD80 in Reaktion auf 6 h Stimulation mit LPS.

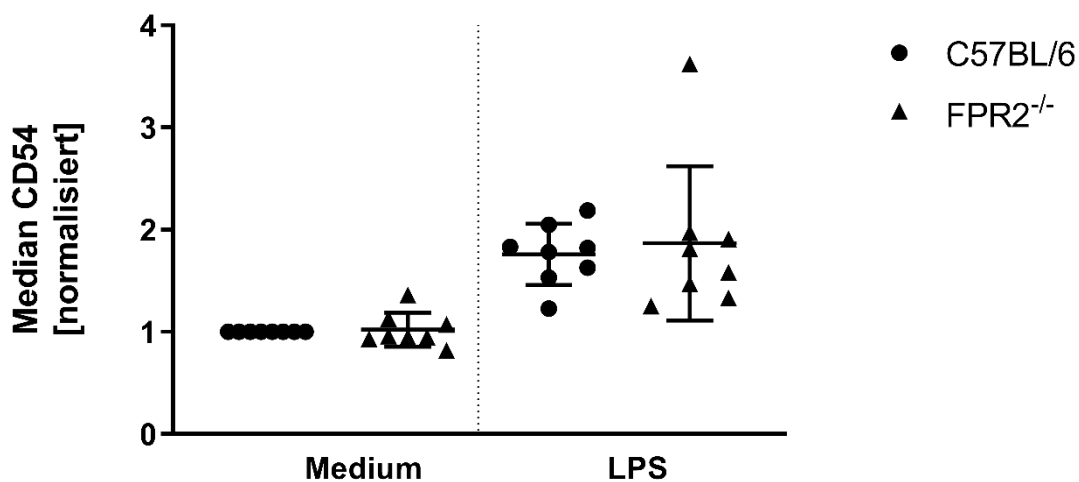


**Abbildung 42: Normalisierte Mediane von CD80 auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne und nach 24 h Stimulation mit LPS.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-way ANOVA mit Šidáks multiple comparisons Test. C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide nicht stimuliert:  $p=0,9962$ ; C57BL/6 nicht stimuliert vs. C57BL/6 24 h LPS:  $p=0,1227$ ; FPR2<sup>-/-</sup> nicht stimuliert vs. FPR2<sup>-/-</sup> 24 h LPS:  $p=0,2647$ ; C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide 24 h LPS:  $p=0,3296$ . Die Daten wurden in 8 Versuchen erhoben.

Nach 24 h zeigten die nicht stimulierten Ansätze beider Mauslinien ähnliche Mediane der Expression von CD80 auf der Zelloberfläche der BMDCs (Abb.42). Der normalisierte Mittelwert der nicht stimulierten BMDCs von C57BL/6-Mäusen betrug hierbei 1,00. Die mittlere Ausprägung von CD80 auf der Oberfläche von nicht stimulierten FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs betrug 0,9713. Wie auch bei den 6 h Ansätzen ist hier zwar eine Tendenz der höheren CD80 Expression in C57BL/6-Mäusen vorhanden, der Unterschied ist jedoch wieder nur gering. In der statistischen der statistischen Analyse ist der Unterschied in der Expression von CD80 zwischen den nicht stimulierten BMDCs beider Mauslinien nicht signifikant ( $p=0,9962$ ).

Die 24 h mit LPS stimulierten Ansätze zeigten im Vergleich zu den nicht stimulierten Ansätzen einen Anstieg der CD80 Expression auf den Zelloberflächen der BMDCs (Abb.42). Dieser Unterschied war deutlich, auch wenn er geringer als nach 6 h Stimulation war. Die C57BL/6-Mäuse zeigten hier mit einem normalisierten Mittelwert der CD80 Mediane von 2,706 einen höheren

Mittelwert als die FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse mit einem Mittelwert von 2,066. Die Varianz der normalisierten Mittelwerte war trotz der Normalisierung der Werte sehr ausgeprägt. Die statistische Analyse der mit LPS stimulierten BMDCs zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,3296$ ) bezüglich der CD80 Expression zwischen C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen. Der Vergleich der nicht stimulierten und stimulierten BMDCs der jeweiligen Mauslinie zeigte nach 24 h einen Unterschied zu den 6 h Ansätzen. Denn, obwohl der Unterschied im Diagramm zwischen stimulierten und nicht stimulierten BMDCs deutlich zu sehen war, so war doch die Streuung der Werte im Vergleich zu den 6 h Ansätzen höher ausgeprägt (Abb.42). Die statistische Analyse zeigte weder bei C57BL/6- ( $p=0,1227$ ) noch bei FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs ( $p=0,2647$ ) signifikante Unterschiede in der Expression von CD80 zwischen nicht stimulierten und stimulierten BMDCs. Nach 24 h der Stimulation mit LPS zeigten die BMDCs beider Mauslinien keinen Unterschied in ihrer Expression von CD80.

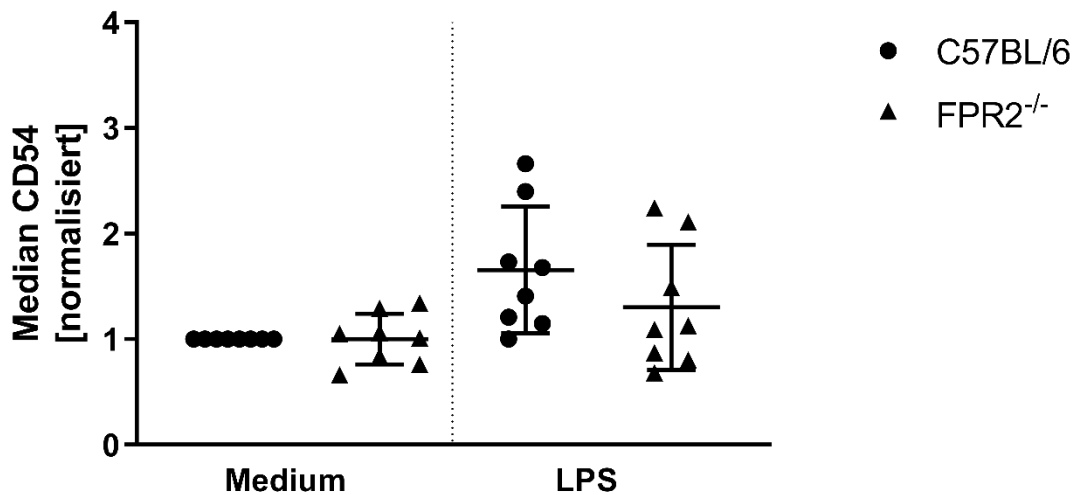


**Abbildung 43: Normalisierte Mediane von CD54 auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne und nach 6 h Stimulation mit LPS.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-way ANOVA mit Šidáks multiple comparisons Test. C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide nicht stimuliert:  $p=0,9945$ ; C57BL/6 nicht stimuliert vs. C57BL/6 6 h LPS:  $p=0,0007$ ; FPR2<sup>-/-</sup> nicht stimuliert vs. FPR2<sup>-/-</sup> 6 h LPS:  $p=0,0265$ ; C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide 6 h LPS:  $p=0,9962$ . Die Daten wurden in 8 Versuchen erhoben.

Das Oberflächenprotein CD54 oder auch ICAM-1 zählt zwar nicht wie die anderen untersuchten Oberflächenproteine zu den costimulatorischen Proteinen, zeigte aber ebenfalls einen Anstieg der Expression als Reaktion auf die Stimulation.

Bei den 6 h Ansätzen zeigten die nicht stimulierten BMDCs ähnliche Werte bei C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb.43). Dies spiegelten auch die normalisierten Mittelwerte der Mediane wider, die mit 1,00 (C57BL/6) und 1,021 (FPR2<sup>-/-</sup>) nur eine geringe Differenz zeigten. Im statistischen Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,9945$ ) in der Expression von CD54 bei nicht stimulierten BMDCs von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen nach 6 h.

Nach 6 h Stimulation mit LPS zeigten die BMDCs beider Mauslinien einen Anstieg der Expression von CD54 (Abb.43). Dies ließ sich auch von den normalisierten Mittelwerten der CD54 Mediane ableiten. Diese zeigten mit 1,758 (C57BL/6) und 1,868 (FPR2<sup>-/-</sup>) einen Anstieg gegenüber den Mittelwerten der nicht stimulierten BMDCs, zeigten aber ebenfalls nur eine geringe Differenz untereinander. Diese Differenz zwischen C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs in der Expression von CD54 nach 6 h Stimulation mit LPS war in der statistischen Analyse nicht signifikant ( $p=0,9962$ ). Im Vergleich der nicht stimulierten und mit LPS stimulierten BMDCs innerhalb der beiden Mauslinien zeigten sich sowohl bei C57BL/6- ( $p=0,0007$ ) als auch bei FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $p=0,0265$ ) signifikante Unterschiede (Abb.43). Zusammenfassend zeigten die BMDCs von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen keinen Unterschied in der Ausprägung von CD54 als Reaktion auf die Stimulation mit LPS.



**Abbildung 44: Normalisierte Mediane von CD54 auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne und nach 24 h Stimulation mit LPS.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-way ANOVA mit Šidáks multiple comparisons Test. C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide nicht stimuliert:  $p > 0,9999$ ; C57BL/6 nicht stimuliert vs. C57BL/6 24 h LPS:  $p = 0,0683$ ; FPR2<sup>-/-</sup> nicht stimuliert vs. FPR2<sup>-/-</sup> 24 h LPS:  $p = 0,4929$ ; C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide 24 h LPS:  $p = 0,3685$ . Die Daten wurden in 8 Versuchen erhoben.

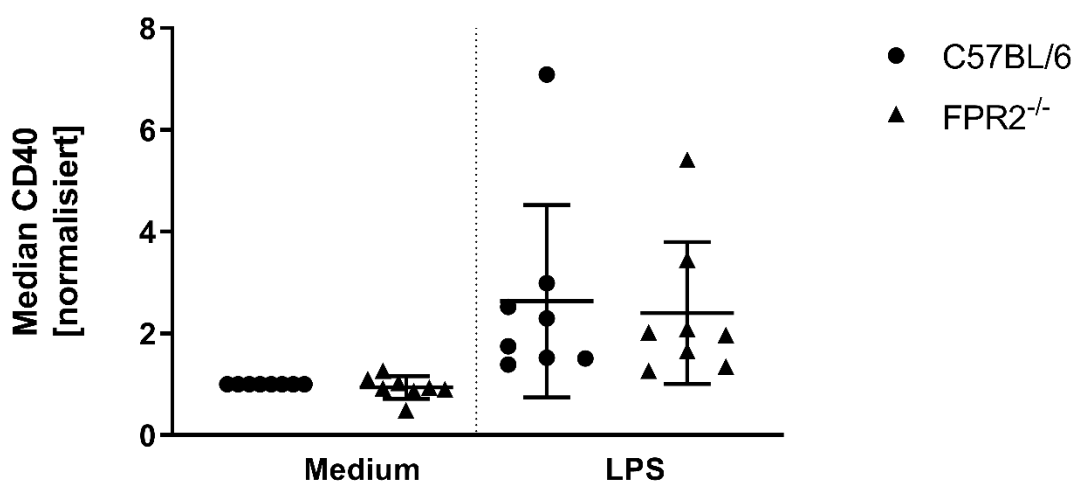
Nach 24 h zeigten sich die nicht stimulierten BMDCs von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen beinahe identisch in ihrer CD54 Expression (Abb.44). Die normalisierten Mittelwerte der CD54 stützten diese Beobachtung. Sie waren mit 1,000 bei den C57BL/6-Mäusen und bei den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen mit 1,001 ebenfalls fast identisch. Die statistische Analyse zeigte keinen statistischen Unterschied zwischen den BMDCs beider Mauslinien ( $p > 0,9999$ ). Die 24 h mit LPS stimulierten BMDCs zeigten einen Anstieg der Expression von CD54 im Vergleich mit den nicht stimulierten BMDCs (Abb.44). Wie auch bei den anderen gemessenen Oberflächenproteinen zeigten die BMDCs in Bezug auf die Expression von CD54 nach 24 h eine große Streuung, größer als nach 6 h. Ebenso war der mittlere Anstieg der CD54 Expression nach 24 h geringer als nach 6 h. Dieser betrug als normalisierter Mittelwert 1,655 bei den C57BL/6- BMDCs und 1,301 auf der Oberfläche von BMDCs aus FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die CD54 Expression schien also nach 24 h Stimulation bei den BMDCs der C57BL/6-Mäuse höher zu sein als bei



denen der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse. In der statistischen Analyse zeigte sich dieser Unterschied jedoch als nicht signifikant (p=0,3685).

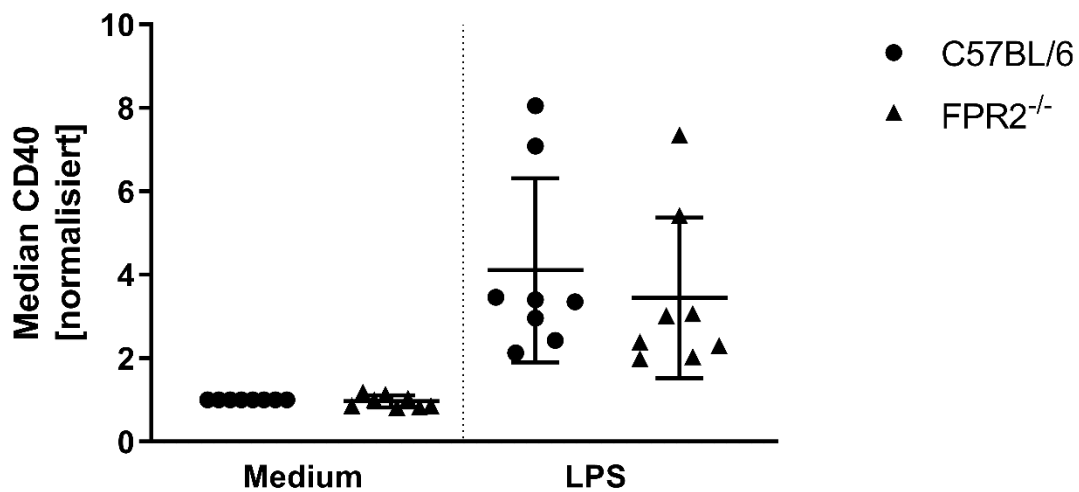
Im Vergleich der CD54 Expression von nicht stimulierten und stimulierten BMDCs nach 24 h innerhalb der jeweiligen Mauslinie zeigte sich ein Anstieg in Reaktion auf die Stimulation (Abb.44). Dieser Anstieg war jedoch von Maus zu Maus recht variabel und somit die Streuung der Werte hoch. Dies zeigte sich auch in der statistischen Analyse. Hier zeigte sich weder bei den C57BL/6- (p=0,0683) als auch bei den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen (p=0,4929) ein signifikanter Unterschied zwischen nicht stimulierten und stimulierten BMDCs. Nach 24 h exprimierten die BMDCs beider Mauslinien also in der gleichen Weise CD54 in Reaktion auf die Stimulation mit LPS.

Weiterhin wurde die Expression von CD40, oder Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie 5, auf der Zelloberfläche von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen in Reaktion auf Stimulation mit LPS untersucht.



**Abbildung 45: Normalisierte Mediane von CD40 auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne und nach 6 h Stimulation mit LPS.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-way ANOVA mit Šidáks multiple comparisons Test. C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide nicht stimuliert: p=0,9234; C57BL/6 nicht stimuliert vs. C57BL/6 6 h LPS: p=0,1655; FPR2<sup>-/-</sup> nicht stimuliert vs. FPR2<sup>-/-</sup> 6 h LPS: p=0,1111; C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide 6 h LPS: p=0,8374. Die Daten wurden in 8 Versuchen erhoben.

In den 6 h Ansätzen zeigten die nicht stimulierten BMDCs der C57BL/6-Mäuse eine etwas höhere Expression von CD40 (Abb.45). Der normalisierte Mittelwert der CD40 Mediane lag hier bei den C57BL/6-Mäusen mit 1,00 etwas höher als bei den FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen mit 0,94. Dieser Unterschied zeigte sich in der statistischen Analyse als nicht signifikant ( $p=0,9234$ ). Nach 6 h Stimulation mit LPS zeigten sowohl C57BL/6- als auch FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse einen Anstieg der Expression von CD40 auf der Oberfläche der BMDCs (Abb.45). Wie auch bei den nicht stimulierten BMDCs zeigten auch die 6 h stimulierten C57BL/6-BMDCs tendenziell eine höhere CD40 Expression als die BMDCs der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse. Dies schlug sich ebenfalls in den normalisierten Mittelwerten nieder. Hier war der Mittelwert der C57BL/6-Mäuse mit 2,634 etwas höher ausgeprägt als der Mittelwert der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse mit 2,404. Diese tendenziell höhere Expression von CD40 nach 6 h Stimulation mit LPS war in der statistischen Analyse jedoch nicht signifikant höher als die Expression auf FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs ( $p=0,8374$ ). Im direkten Vergleich von nicht stimulierten und stimulierten BMDCs der jeweiligen Mauslinie untereinander zeigten sowohl C57BL/6- ( $p=0,1655$ ) als auch FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse ( $p=0,1111$ ) keinen signifikanten Unterschied der CD40 Expression (Abb.45). Die Untersuchung ergab also, dass BMDCs von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen nach 6 h Stimulation mit LPS keine unterschiedliche Expression von CD40 in der Reaktion zeigen. Ebenso wurde bei den nicht stimulierten BMDCs nach 8 Tagen Inkubation und Reifung kein Unterschied zwischen den beiden Mauslinien festgestellt.



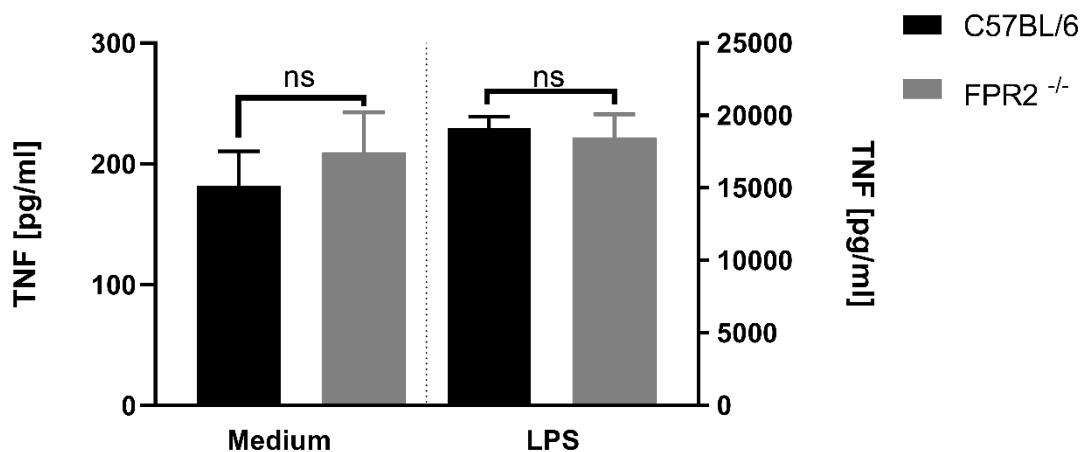
**Abbildung 46: Normalisierte Mediane von CD40 auf der Oberfläche von BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne und nach 24 h Stimulation mit LPS.** Es handelt sich um die Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Dargestellt ist der Mittelwert mit SD der normalisierten Werte. Die Daten wurden mit dem Mittelwert der C57BL/6-Mäuse normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-way ANOVA mit Sidáks multiple comparisons Test. C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide nicht stimuliert:  $p=0,9587$ ; C57BL/6 nicht stimuliert vs. C57BL/6 24 h LPS:  $p=0,0208$ ; FPR2<sup>-/-</sup> nicht stimuliert vs. FPR2<sup>-/-</sup> 24 h LPS:  $p=0,0291$ ; C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide 24 h LPS:  $p=0,0582$ . Die Daten wurden in 8 Versuchen erhoben.

In den 24 h Ansätzen zeigten die nicht stimulierten BMDCs der C57BL/6-Mäuse eine etwas höhere Expression von CD40 als die FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse (Abb.46). Der normalisierte Mittelwert lag unter den C57BL/6-BMDCs mit 1,00 höher als bei den FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs mit 0,9675. In der statistischen Analyse zeigte sich die höhere CD40 Expression von nicht stimulierten BMDCs jedoch als nicht signifikant ( $p=0,9587$ ). Die stimulierten BMDCs zeigten einen Anstieg der CD40 Expression in Reaktion auf die Stimulation mit LPS bei beiden Mauslinien (Abb.46). Der Anstieg war dabei, anders als bei anderen untersuchten Oberflächenmolekülen (z.B. CD54), nach 24 h deutlich höher als nach 6 h der Stimulation. Ebenso zeigte sich die CD40-Expression der C57BL/6-BMDCs im Durchschnitt höher als die der FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs (Abb.46). Dies wurde durch die normalisierten Mittelwerte der CD40 Mediane bestätigt. Der Mittelwert der Expression auf der Oberfläche von C57BL/6-BMDCs betrug nach 24 h Stimulation 4,109, der Mittelwert im Falle der FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs 3,448. Trotz dieses

Unterschiedes zeigte sich die höhere CD40 Expression der C57BL/6-BMDCs in der statistischen Analyse als nicht signifikant ( $p=0,0582$ ). Weiterhin wurden die 24 h nicht stimulierten und stimulierten Zellen der jeweiligen Mauslinien untereinander verglichen. Bei beiden Mauslinien stieg die Expression von CD40 in Reaktion auf die Stimulation an. In der statistischen Analyse zeigten die stimulierten BMDCs sowohl von C57BL/6- ( $p=0,0208$ ) als auch von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $p=0,0291$ ), eine signifikant höhere CD40-Expression als die nicht stimulierten BMDCs. Nach 24 h der Stimulation mit LPS prägten C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse also in Reaktion CD40 auf die gleiche Art und Weise aus. Insgesamt gab es kaum Unterschiede zwischen C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs in Reaktion auf die Stimulation mit LPS.

### 3.6 Der FPR2 zeigt einen Einfluss auf die Sezernierung von IL-10

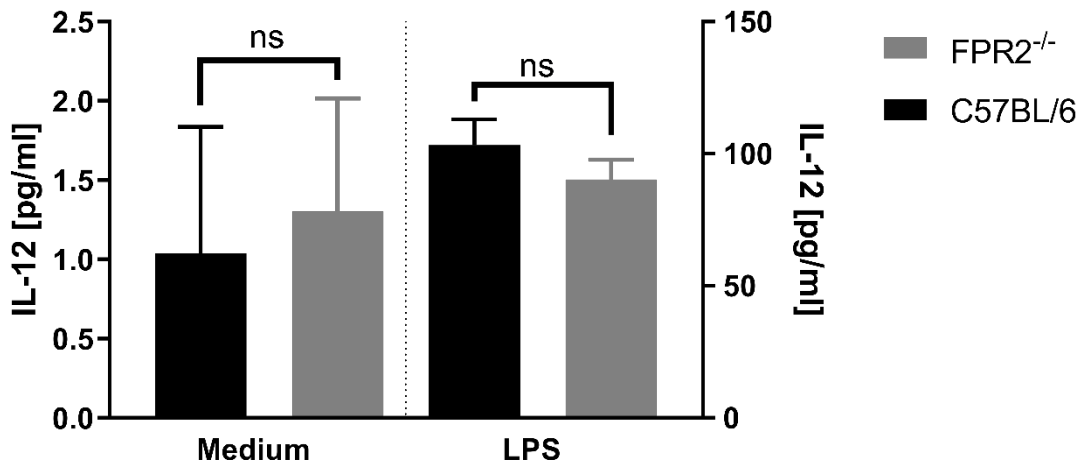
Dendritische Zellen beeinflussen Immunreaktionen unter anderem durch das Sezernieren von Entzündungsmediatoren. Diese Entzündungsmediatoren, auch Zytokine genannt, beeinflussen Migrationsverhalten und Proliferation von Immunzellen. Um zu analysieren, ob der FPR2 einen Einfluss auf die Sezernierung von Zytokinen hat, wurden BMDCs in vitro für 24 Stunden mit LPS stimuliert. Im Anschluss wurden die Medium-Überstände entnommen und per ELISA bezüglich ihrer Konzentrationen von TNF, IL-10 und IL-12 analysiert. Die Konzentrationen der sezernierten Zytokine von nicht stimulierten und stimulierten BMDCs der C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden dann miteinander verglichen.



**Abbildung 47: Sezernierte Konzentration von TNF durch BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne und nach 24 h Stimulation mit LPS.** Die Konzentration von TNF wurde durch ELISA ermittelt. In den jeweiligen Säulen sind die Werte aller biologischen Replikate zusammengefasst. Dargestellt ist der SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-way ANOVA mit Sidáks multiple comparisons Test. C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide nicht stimuliert:  $p=0,7530$ ; C57BL/6 nicht stimuliert vs. C57BL/6 24 h LPS:  $p<0,0001$ ; FPR2<sup>-/-</sup> nicht stimuliert vs. FPR2<sup>-/-</sup> 24 h LPS:  $p<0,0001$ ; C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide 24 h LPS:  $p=0,9818$ . Die Daten wurden in 8 Versuchen erhoben.

Die Konzentration des pro-inflammatorischen Zytokins TNF stellte sich in Ansätzen ohne LPS-Stimulation bei C57BL/6- niedriger als bei FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen dar (Abb.47). Der Mittelwert der TNF-Konzentration, die von den nicht stimulierten C57BL/6-BMDCs sezerniert wurde betrug 182,0 pg/ml. Der Mittelwert der sezernierten TNF-Konzentration durch die FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs fiel mit 209,5 pg/ml höher als der der C57BL/6-BMDCs aus. Die Sezernierung von TNF war im Fall der nicht stimulierten FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs jedoch nicht signifikant höher ( $p= 0,7530$ ). Die für 24 h LPS stimulierten BMDCs zeigten einen Anstieg der TNF-Konzentration im Vergleich zu den nicht stimulierten BMDCs (Abb.47). Dieser Anstieg der Konzentration von TNF nach 24 h Stimulation war sowohl im bei C57BL/6- ( $p= <0,0001$ ) als auch bei FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs ( $p= <0,0001$ ) signifikant. Die mit LPS stimulierten BMDCs der C57BL/6-Mäuse steigerten die Sezernierung von TNF etwas stärker als die BMDCs der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse (Abb.47). Auch die Mittelwerte der TNF-Konzentration in den stimulierten Ansätzen bestätigten diesen Trend. Die mittlere TNF-Konzentration in den C57BL/6-Ansätzen war mit 19.125 pg/ml höher als der Mittelwert der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse mit 18.455 pg/ml. Diese

Tendenz der höheren TNF-Sezernierung durch C57BL/6-BMDCs bestätigte sich jedoch in der statistischen Analyse nicht als signifikant ( $p=0,9818$ ). Nach 24 h der Stimulation zeigten die stimulierten BMDCs von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen keinen Unterschied in der sezernierten Konzentration von TNF.



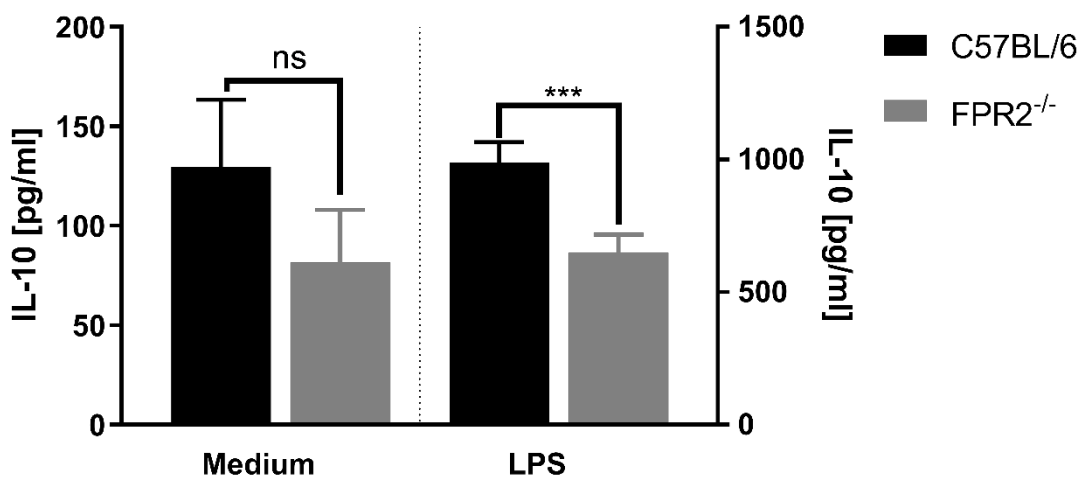
**Abbildung 48: Sezernierte Konzentration von IL-12 durch BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne und nach 24 h Stimulation mit LPS.** Die Konzentration von IL-12 wurde durch ELISA ermittelt. In den jeweiligen Säulen sind die Werte aller biologischen Replikate zusammengefasst. Dargestellt ist der SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-way ANOVA mit Šidáks multiple comparisons Test. C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide nicht stimuliert:  $p=0,9867$ ; C57BL/6 nicht stimuliert vs. C57BL/6 24 h LPS:  $p=<0,0001$ ; FPR2<sup>-/-</sup> nicht stimuliert vs. FPR2<sup>-/-</sup> 24 h LPS:  $p=<0,0001$ ; C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide 24 h LPS:  $p=0,4496$ . Die Daten wurden in 8 Versuchen erhoben.

Im Weiteren wurde die Sezernierung des Interleukins 12 (IL-12) und die entsprechende Reaktion auf die Stimulation mit LPS untersucht (Abb.48). Die nicht stimulierten BMDCs beider Mauslinien zeigten vergleichbare Konzentrationen von IL-12. Die mittlere Konzentration von IL-12 der nicht stimulierten C57BL/6-BMDCs betrug 1,041 pg/ml. Die nicht stimulierten BMDCs der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse sezernierten im Durchschnitt IL-12 in einer Konzentration von 1,305 pg/ml. Dieser geringfügige Unterschied zeigte in der statistischen Analyse keine Signifikanz ( $p=0,9867$ ).

In Reaktion auf die 24 h Stimulation mit LPS zeigten sowohl die C57BL/6- als auch die FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs einen Anstieg der IL-12-Sezernierung (Abb.48). Bei C57BL/6- ( $p=<0,0001$ ) und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $p=<0,0001$ ) war der Anstieg der IL-12-Sezernierung in der statistischen Auswertung signifikant. Im Vergleich der

stimulierten BMDCs beider Mauslinien zeigte sich eine höhere IL-12-Sekretion durch C57BL/6-BMDCs als durch FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs (Abb.48). Die C57BL/6-BMDCs sezernierten im Durchschnitt 103,3 pg/ml, die FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs zeigten eine mittlere Konzentration von 90,23 pg/ml nach 24 h Stimulation. Die höhere Sezernierung von IL-12 durch die C57BL/6-BMDCs war nach statistischer Analyse nicht signifikant (p=0,4496).

Zu guter Letzt wurde die Sezernierung von Interleukin 10 (IL-10) durch die BMDCs von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen nach LPS-Stimulation und ohne Stimulation untersucht. IL-10 gilt im Gegensatz zu den beiden oben untersuchten Zytokinen als inhibierend für Immunfunktionen.



**Abbildung 49: Sezernierte Konzentration von IL-10 durch BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne und nach 24 h Stimulation mit LPS. Die Konzentration von IL-10 wurde durch ELISA ermittelt. In den jeweiligen Säulen sind die Werte aller biologischen Replikate zusammengefasst. Dargestellt ist der SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-way ANOVA mit Šidáks multiple comparisons Test. C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide nicht stimuliert: p=0,6638; C57BL/6 nicht stimuliert vs. C57BL/6 24 h LPS: p=<0,0001; FPR2<sup>-/-</sup> nicht stimuliert vs. FPR2<sup>-/-</sup> 24 h LPS: p=<0,0001; C57BL/6 vs. FPR2<sup>-/-</sup>, beide 24 h LPS: p=0,0001. Die Daten wurden in 8 Versuchen erhoben.**

Bereits die nicht stimulierten BMDCs zeigten eine etwas höhere Sezernierung von IL-10 durch die C57BL/6-BMDCs (Abb. 49). Dies schlug sich ebenfalls in den Mittelwerten beider Mauslinien nieder. Die C57BL/6-BMDCs sezernierten im Mittel 129,8 pg/ml pro Ansatz, die FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs zeigten eine mittlere Konzentration von 81,51 pg/ml. In der statistischen Analyse war dieser

Unterschied in der Sezernierung von IL-10 jedoch nicht signifikant ( $p=0,6638$ ). Die BMDCs beider Mauslinien zeigten in Reaktion auf die 24 h Stimulation mit LPS einen Anstieg der IL-10-Sezernierung (Abb.49). Dieser Anstieg und damit der Unterschied in der IL-10-Konzentration zeigte sich sowohl bei C57BL/6- ( $p<0,0001$ ) als auch bei FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $p<0,0001$ ) als statistisch signifikant. Die 24 h mit LPS stimulierten BMDCs zeigten eine deutlich erhöhte Konzentration von IL-10 in den Ansätzen der C57BL/6-Mäusen im Vergleich mit der von den FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs sezernierten Menge (Abb.49). Im Mittel sezernierten die C57BL/6-BMDCs 987,7 pg/ml IL-10 in 24 h Stimulation. Die FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs sezernierten mit 650,0 pg/ml IL-10 im Durchschnitt deutlich weniger. Die statistische Analyse der Daten ergab, dass die C57BL/6-BMDCs signifikant mehr IL-10 sezernieren ( $p=0,0001$ ) als die FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs.

## 4 Diskussion

Die Homöostase Dendritischer Zellen in lymphatischen und nicht lymphatischen Organen ist eine kritische Größe für die adäquate Funktion des Immunsystems. In vorherigen Versuchen der Arbeitsgruppe wurden höhere Zahlen von Dendritischen Zellen und ihrer Subpopulationen in der Milz von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen nachgewiesen.

Zur genaueren Beleuchtung der Hintergründe wurde in dieser Arbeit der Einfluss des FPR2 auf die Homöostase Dendritischer Zellen im murinen Modell untersucht. In den Versuchen wurden Vorläuferzellen, DC-Populationen, Apoptose-Verhalten, intrazelluläre Bcl-2-Konzentrationen und Maturation zwischen FPR2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6-Mäusen verglichen. Dies geschah durch durchflusszytometrische Analyse und die Untersuchung von sezernierten Zytokinen.

Es bestand kein Unterschied in prozentualer Verteilung und absoluten Zellzahlen von Vorläuferzellen im Knochenmark von FPR2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6-Mäusen. In den Splenes von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden höhere prozentuale Anteile von CD8<sup>+</sup> DCs gezeigt, aber in den Splenes von C57BL/6-Mäusen wurden höhere Anteile an CD8<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> DCs gefunden. Ein Unterschied in der absoluten Zellzahl wurde nicht



beobachtet. Im durchflusszytometrischen Apoptose-Assay zeigten alle untersuchten DC-Subpopulationen (CD8<sup>+</sup> DCs, CD4<sup>+</sup> DCs, CD8<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> DCs) in der Milz von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen geringere Mengen spät-apoptotischer Zellen als in der Milz von C57BL/6-Mäusen. Nicht zu den DCs zählende Zellen zeigten keinen Unterschied in der Apoptose. In den DC-Subpopulationen der Milz von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen konnten, im Vergleich mit C57BL/6-Mäusen, erhöhte Konzentrationen des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 gezeigt werden. Es zeigten sich keine Unterschiede der Maturation von BMDCs auf einen Stimulationsreiz mit LPS. Es wurde jedoch beobachtet, dass die FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs signifikant weniger IL-10 als die C57BL/6-BMDCs sezernierten.

## 4.1 Diskussion der Methoden

### 4.1.1 Verwendung von BMDCs

Die Verwendung von BMDCs ist eine gut etablierte Methode zur Untersuchung von DCs *in vitro*. BMDCs werden bereits seit einige Jahren verwendet, um Reaktionen von DCs auf isolierte Stimuli in Kultur untersuchen zu können (Sallusto et al., 1995, Inaba et al., 1992, Lutz et al., 1999). In den letzten Jahren wurde jedoch gezeigt, dass die BMDCs als Population heterogener sind als bisher angenommen (Helft et al., 2015). Außerdem ähneln die, mit GM-CSF generierten, BMDCs inflammatorischen moDCs in Phänotyp und Funktion (Xu et al., 2007, Segura and Amigorena, 2013). Deshalb sind sie zur Untersuchung von DCs im steady state nur bedingt geeignet. In dieser Arbeit wurde die Homöostase Dendritischer Zellen im steady state untersucht. Deshalb wären DCs, die aus Knochenmarkszellen mithilfe des Zytokins Flt3L generiert wurden, besser geeignet gewesen (Guo et al., 2016). Dies gelang in mehreren Versuchen jedoch nicht. Eine Untersuchung der Maturation von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-DCs, die mit Flt3L in Kultur generiert wurden, ist eine sinnvolle Untersuchung zur weiteren Analyse des FPR2-Einflusses.

### 4.1.2 Analyse von intrazellulären Bcl-2-Mengen

Die intrazelluläre Bcl-2-Menge wurde in Milz-DCs von FPR2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6-Mäusen untersucht und verglichen. Hierfür wurde eine intrazelluläre Färbung mit

Fluorochrom-beladenen Bcl-2-Antikörpern vorgenommen und diese durchflusszytometrisch analysiert.

Diese Methode ist zur Quantifizierung von Bcl-2 in Malignom-Zellen gut im klinischen Alltag etabliert. Vorteile dieser Methode sind die schnelle und verschiedene Parameter umfassende Analyse, sowie die gezielte Untersuchung spezieller DC-Populationen (Van Stijn et al., 2003, Erduran et al., 2004, Ludwig et al., 2019). Mit dieser Methode konnten signifikante Unterschiede in der intrazellulären Menge von Bcl-2 zwischen C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigt werden (s. Kap. 3.4.). Um diese Ergebnisse zu bestärken, wäre eine zusätzliche Expressionsanalyse per qPCR sinnvoll gewesen. Diese Methode wird ebenfalls zur individuellen Therapie-Entscheidung und Prognostik in der Onkologie angewendet (Placzek et al., 2010). Die Kombination beider Methoden hätte hier zu noch überzeugenderen Ergebnissen zum Einfluss des FPR2 auf die Expression von Bcl-2 in DCs führen können. Um ebenfalls eine eindeutige Aussagen zu der daraus resultierenden Apoptose-Sensibilität zu treffen, wäre außerdem eine zusätzliche Untersuchung von pro-apoptischen Proteinen der Bcl-2-Familie sinnvoll gewesen. Denn die Apoptose-Sensibilität einer Zelle resultiert aus dem Verhältnis von pro- und anti-apoptischen Proteinen dieser Familie.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Der FPR2 hat keinen Einfluss auf prozentuale Verteilung und Zellzahlen von DC-Vorläufern im Knochenmark

Eine Stellschraube der DC-Homöostase ist die Wiederauffüllung der DCs durch Vorläuferzellen. Eine veränderte Zahl oder Verteilung dieser Vorläufer, zum Beispiel durch veränderte Differenzierung, kann die Homöostase Dendritischer Zellen maßgeblich beeinflussen. In dieser Arbeit zeigte sich kein Einfluss des FPR2 auf diesen Mechanismus. Chen et al. konnten zeigen, dass ein Mangel an FPR2 zu reduzierten Zahlen von myeloiden Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>hi</sup> hämatopoetischen Stammzellen führt (Chen et al., 2018). Diese pluripotenten Stammzellen der myeloiden Zellreihe verfügen über ein DC-Potenzial. Diese Arbeit konzentrierte sich auf spätere DC-Vorläufer wie MDPs, CDPs und pre-DCs. FPR2<sup>-/-</sup>- und

C57BL/6-Mäuse zeigten keine signifikanten Unterschiede in prozentualer Verteilung oder absoluter Zellzahl von Vorläuferzellen wie MDP, CDP oder pre-DCs (s.Kap. 3.1). DCs differenzieren sich sowohl aus myeloiden als auch aus lymphatischen Vorläufern (Kondo et al., 2001, Manz et al., 2001). Eine mangelnde Proliferation von myeloiden Stammzellen muss also nicht zwangsläufig mit einer Reduktion von späten DC-Vorläufern zusammenhängen. Jedoch müsste ein Ausgleichsmechanismus existieren, durch den sich lymphatische Stammzellen vermehrt in DC-Vorläufer differenzieren, damit sich der Mangel myeloider Stammzellen nicht in späteren Stadien niederschlägt. Chen et al. zeigten weiterhin eine Reduktion und reduzierte Reifung von myeloiden Zellen (vor allem Granulozyten und Monozyten) im Knochenmark von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen (Chen et al., 2018). Eine Reduktion von Monozyten im Knochenmark von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden (s.Kap. 3.1). Möglicherweise hat der FPR2 mehr Einfluss auf Proliferation und Differenzierung von rein myeloiden Zellreihen. Wegen ihrer nach wie vor nicht vollständig geklärten Abstammung fällt eine genaue Einordnung der DCs hier noch schwer. Wichtig wäre es noch, die Einflüsse des FPR2 auf die lymphatische Zellreihe zu untersuchen, um konkretere Aussagen treffen zu können.

Eine weitere Untersuchung von Interesse wäre die Migration der pre-DCs. Im Stadium der pre-DCs verlässt ein Großteil der Zellen das Knochenmark und wandert über die Blutbahn in die Peripherie oder lymphatische Organe ein (Liu et al., 2009). Hier würde ein verändertes Migrationsverhalten der pre-DCs einen maßgeblichen Einfluss auf die Homöostase in den jeweiligen Organen haben. Dies wäre ein Mechanismus, der im Zusammenhang mit der Wiederauffüllung von DCs in verschiedenen Geweben noch zu untersuchen wäre. Besonders vor dem Hintergrund, dass ein Einfluss des FPR2 auf die Chemotaxis von Neutrophilen Granulozyten in Mäusen beobachtet wurde (Hartt et al., 1999).

#### 4.2.2 Der FPR2 zeigt Einfluss auf die prozentuale Verteilung von DC-Populationen in der Milz

Eine signifikant höhere Zahl von DCs in der Milz von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen, wie sie sich bei Armbruster et al. (Armbruster et al., unveröffentlichte Ergebnisse) zeigte,

konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Jedoch zeigten sich Unterschiede in den prozentualen Anteilen von einzelnen DC-Subpopulationen an der Gesamtheit von Milz-Zellen. Lediglich in der CD8<sup>+</sup> DC Subpopulation konnten signifikant höhere Anteile an den Milzzellen beobachtet werden. Die Population der CD8<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> DCs von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte gar signifikant niedrigere prozentuale Anteile als die identische Population der C57BL/6-Mäuse. Möglicherweise beruht dies auf einer gesteigerten Zahl anderer Zell- Populationen in der Milz von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen. Tatsächlich wurden in diesen Versuchen sowohl bei FPR2<sup>-/-</sup>- als auch bei C57BL/6-Mäusen recht niedrige prozentuale Anteile der DCs an den gesamten lebenden Zellen der Milz beobachtet. In der Literatur variieren die Angaben zum prozentualen Anteil Dendritischer Zellen. Meistens wird ein Anteil von ca. 1 - 3 % DC unter den lebenden Milz-Zellen angegeben, teilweise auch unter 1 %. In jedem Fall bleiben die DCs jedoch unter 5 %. Der prozentuale Anteil der DCs wird durch verschiedene Faktoren wie Infektionen, Autoimmunität aber auch durch endogene Hormone und andere Mediatoren beeinflusst (Steinman et al., 1979, Duriancik and Hoag, 2009, Merad et al., 2013). In den Versuchen dieser Arbeit bildeten die DCs im Mittel 1,609 % (C57BL/6) und 1,689 % (FPR2<sup>-/-</sup>) der lebenden Milz-Zellen. Damit fiel hier der prozentuale Anteil der DCs eher niedrig aus. Dies könnte einen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Trotzdem scheint ein Einfluss des FPR2 auf die prozentuale Verteilung verschiedener DC-Subpopulationen in der Milz zu bestehen. Dieser Einfluss ist jedoch nicht so ausgeprägt wie in Fällen von Flt3, IRF8, IRF4 oder anderen wichtigen Faktoren für die DC-Differenzierung (Sichien et al., 2016, Karsunky et al., 2003, Merad et al., 2013). Diese Ergebnisse bezüglich des Einflusses des FPR2 auf Zellzahlen und prozentuale Verteilungen von Milz-DCs und ihren Subpopulationen lassen wenig eindeutige Aussagen zu. Die multifaktorielle Regulierung der DC-Homöostase, die Heterogenität der DCs und die funktionale Promiskuität des FPR2 sind Faktoren, die dieser Uneindeutigkeit zugrunde liegen.

#### 4.2.3 In der Milz zeigen ansässige FPR2<sup>-/-</sup>-DCs ein besseres Überleben als C57BL/6-DCs

In den Splenes der C57BL/6-Mäuse konnte eine signifikant höhere Menge an spät-apoptotischen DCs gezeigt werden als in denen von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen. Dies traf auch in der genaueren Betrachtung für alle DC-Subpopulationen zu. Parallel dazu zeigten sich unter den DCs und zwei ihrer Subpopulationen, CD8<sup>+</sup> und CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup> DCs, der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant mehr lebende Zellen. Jedoch fällt auf, dass zwar Tendenzen von mehr früh-apoptotischen Zellen unter C57BL/6-DCs bestehen, diese erreichen jedoch keine signifikanten Ausmaße. Die Apoptose wird häufig als ein Prozess betrachtet, der nach dem „point of no return“ nicht mehr gestoppt werden kann. Jedoch beobachteten Geske et al. 2001 eine Reversibilität eines frühen apoptotischen Stadiums nach Apoptose-Induktion durch p53 (Geske et al., 2001). Ein positiver Einfluss des FPR2 auf die Progression früh-apoptotischer Zellen in spätere Stadien des programmierten Zelltodes könnte diese Ergebnisse also erklären.

Thompson et al. fanden außerdem eine Aminosäure-Sequenz im C-Terminus des FPR2, welche das Recycling des FPR2 nach Interaktion mit bestimmten Liganden initiiert. Bei Interaktion mit anderen Liganden wird jedoch über den FPR2 Apoptose ausgelöst (Thompson et al., 2014). Wenn der FPR2 also die Apoptose, abhängig von verschiedenen Liganden, fördert oder hemmt, könnte dies ebenfalls diese Ergebnisse beeinflussen.

Das Überleben der Milz-DCs sowie ihrer Subpopulationen ist in FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen verbessert. Passend hierzu konnte in den Milz-DCs (und all ihren Subpopulationen) der FPR2<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant höhere Mengen des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 nachgewiesen werden. Eine erhöhte Menge in Milzzellen, die nicht zu den DCs gezählt werden, wurde nicht beobachtet. Dies könnte auf einen Effekt des FPR2, der im murinen Organismus auf DCs limitiert ist, hindeuten.

Die alleinige Betrachtung von Bcl-2, ohne Berücksichtigung anderer Mitglieder der Bcl-2-Familie (besonders der pro-apoptotischen), lässt hier noch keine absoluten Aussagen zu. Denn die Apoptose-Sensibilität von Zellen wird vor allem durch das Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern dieser Familie

bestimmt. Doch wenn ein verbessertes Überleben der DCs sowie ihrer Subpopulationen im Zusammenhang mit höheren intrazellulären Mengen an Bcl-2 beobachtet wird, liegt eine Induktion oder zumindest Förderung der DC-Apoptose durch den FPR2 sehr nah. Nopora und Brocker konnten bereits 2002 eine verbessertes Überleben von DCs bei erhöhter Expression von Bcl-2 nachweisen (Nopora and Brocker, 2002). Auch aktuellere Untersuchungen zeigen eine zentrale Rolle von Bcl-2 in der Regulation der Lebensspanne von DCs (Carrington et al., 2017). Die zusätzliche Betrachtung von anderen pro- und anti-apoptischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie wird jedoch in allen Arbeiten immer wieder betont. Sowohl im wissenschaftlichen als auch im therapeutischen Bereich sei dies ein relevanter Schritt, um handfeste Aussagen treffen zu können. Der FPR2 induziert in humanen Neutrophilen Granulozyten Apoptose und fördert deren Phagozytose durch Makrophagen (Solito et al., 2003). Weiter konnte eine wichtige anti-inflammatorische Rolle des FPR2 beobachtet werden (Dufton et al., 2010). Darüber hinaus spielt die DC-Apoptose bei der Verhinderung von Autoimmunität und Hypersensitivität eine entscheidende Rolle (Chen et al., 2006). Einen Einfluss des FPR2 in der Apoptose-Induktion von DCs erscheint vor diesem Hintergrund wie ein sinnvolles Konzept und zur anti-inflammatorischen Funktion dieses Rezeptors passend. Zur abschließenden Klärung dieses Einflusses durch den FPR2 müssten nun noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Besonders eine erweiterte Expressionsanalyse von Bcl-2 durch qPCR und die Analyse weiterer pro- und anti-apoptischer Proteine der Bcl-2-Familie, in FPR2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6-DCs, wären nun wichtige Untersuchungen.

#### 4.2.4 FPR2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6-BMDCs gleichen sich in ihrer Maturation

Die FPR2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6-BMDCs zeigten sehr ähnliche Reifungszeichen in Form von MHC II, costimulatorischen Molekülen und CD54 nach 6 und 24 h LPS-Stimulation. Signifikante Unterschiede in den Reifemerkmale fielen weder nach 6 noch nach 24 h Stimulation mit LPS auf. Dies zeigt abweichende Ergebnisse zu Chen et al. die in Bezug auf MHC II und CD86 signifikant niedrigere Expressionen durch FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs nach 4 h beobachtet hatten. Vor dem

Hintergrund der beobachteten Heterogenität von BMDCs (Helft et al., 2015) könnten die eindeutigeren Ergebnisse mit einer Aufreinigung der BMDCs durch CD11c<sup>+</sup> MACS (engl.: magnetic cell separation) vor der Stimulation zusammenhängen (Chen et al., 2014). Dies wurde im Versuchsaufbau dieser Arbeit nicht durchgeführt. Hier wurden die Zellen erst im Zuge der durchflusszytometrischen Analyse in Bezug auf ihre CD11c und MHC II Expression betrachtet und alle CD11c<sup>-</sup> Zellen wurden nicht in die Analyse miteinbezogen. Im humanen Organismus beobachteten Yang et al. eine reduzierte Expression des FPR2 durch unreife DCs (generiert aus humanen HSC) nach 7 Tagen in Kultur im Vergleich zu humanen HSCs (Yang et al., 2001). Sollte sich diese Beobachtung auch auf den murinen Organismus übertragen lassen wäre fraglich, inwiefern der FPR2 mit verringerter Expression noch Einfluss auf den Reifungsprozess ausüben kann. Andere Studien konnten jedoch in murinen BMDCs eine Hochregulation des FPR2 nach Aktivierung beobachten (Migeotte et al., 2006, Schreiner et al., 2013). Eine verringerte Expression des FPR2 in murinen BMDCs scheint also in der Konsequenz eher unwahrscheinlich.

#### 4.2.5 Der FPR2 beeinflusst die Sekretion von IL-10

Die 24 h mit LPS stimulierten FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs zeigten eine vergleichbare Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF und IL-12. Die Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 durch die FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs war jedoch signifikant reduziert. Hieraus lässt sich eine wichtige Rolle des FPR2 bei der IL-10 Sekretion ableiten. IL-10 nimmt als anti-inflammatorisches Zytokin eine relevante Funktion in der Toleranzentwicklung und Verhinderung von Autoimmunität ein. Die Funktion von verschiedenen Immunzellen (DCs, T-Lymphozyten etc.) wird dabei autokrin, parakrin und endokrin durch IL-10 beeinflusst (Dolch et al., 2019, Roncarolo et al., 2001, Saraiva and O'Garra, 2010). Der positive Einfluss des FPR2 auf die Sekretion dieses Zytokins, lässt sich sehr gut mit seiner anti-inflammatorischen Funktion vereinbaren. Bestärkt wird dies durch Beobachtungen, nach denen Annexin A1, ein Ligand des FPR2, seine anti-inflammatorische Wirkung unter anderem über die Induktion einer IL-10-Ausschüttung entfaltet (Ferlazzo et al., 2003). Die anti-inflammatorische

Relevanz des murinen FPR2 wurde ebenfalls im Zuge einer verstärkten inflammatorischen Reaktion nach LPS-Stimulus in der Leber von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigt (Giebeler et al., 2014). In einer Studie zum Einfluss der phenol-soluble modulins (engl.: Phenol-lösliche Moduline) von *S. aureus* auf die Funktion von murinen DCs zeigten Schreiner et al. jedoch eine FPR2-unabhängige Steigerung der IL-10 Sezernierung. Zwar konnte gezeigt werden, dass PSM an den murinen FPR2 binden, die gesteigerte IL-10 Sezernierung wurde aber bei WT-DCs und FPR2<sup>-/-</sup>-DCs gleichermaßen beobachtet (Schreiner et al., 2013). Inwieweit der FPR2 bei der Regulierung der Sezernierung von IL-10 eine Rolle spielt, ist also nicht abschließend geklärt.

Der FPR2 verfügt jedoch, als promiskuitiver Rezeptor mit mehreren Domänen und noch mehr Liganden, auch über eine pro-inflammatorische Funktion. Trotzdem konnten keine Unterschiede in der TNF- oder IL-12-Sekretion zwischen FPR2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6-BMDCs gezeigt werden. DCs sezernieren TNF und IL-12 in Reaktion auf einen Stimulus (in diesem Fall LPS). An humanen Neutrophilen Granulozyten wurde gezeigt, dass SAA, ein pro-inflammatorischer Ligand des FPR2, die Sekretion von u.a. TNF induziert (Furlaneto and Campa, 2000). Der FPR2 könnte also einen Einfluss auf die Sekretion von TNF haben, möglicherweise ist hierfür aber die Stimulation durch SAA nötig, welches in unseren Versuchen nicht verwendet wurde. Eine Stimulation von FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs durch SAA wäre also ein interessanter weiterführender Ansatz. Chen et al. konnten zeigen, dass FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs nach Stimulation mit LPS weniger IL-12 sezernieren (Chen et al., 2014). Dies unterstreicht die vielfältigen Funktionen des FPR2, konnte so in dieser Arbeit jedoch nicht reproduziert werden.

### 4.3 Ausblick

Diese Arbeit konnte einen Einfluss des FPR2 auf das Überleben und die anti-inflammatorische Funktion von Dendritischen Zellen zeigen. Der FPR2 beeinflusst hierbei die intrazelluläre Menge an Bcl-2, welches schon in anderen Studien einen Einfluss auf die Langlebigkeit von DCs gezeigt hat (s.Kap. 4.2.3.). Der FPR2 spielt weiterhin eine Rolle in der Sezernierung des anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 durch BMDCs. Sowohl die IL-10 Sekretion durch



DCs als auch deren Apoptose nehmen eine zentrale Rolle in der Verhinderung von Autoimmunität und überschießenden Immunantworten ein. Trotzdem scheint der volle Umfang des FPR2-Einflusses auf die DC-Homöostase damit nicht ganz erfasst zu sein. Denn durch die Interaktion mit verschiedenen Liganden und die resultierenden vielfältigen Funktionen des FPR2, sowie die Heterogenität der DCs bleiben noch viele Fragen ungeklärt und weitere Untersuchungen sind erforderlich.

In den nächsten Schritten ist es wichtig zu klären, wie genau der FPR2 auf die Apoptose Dendritischer Zellen einwirkt. Hierzu sollte eine genaue Expressionsanalyse von pro- und anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie erfolgen, um deren Verhältnis und die damit einhergehende Apoptosesensibilität zu ermitteln. Weiterhin sollte die Maturation von Flt3L-generierten DCs in Kultur untersucht werden, um bessere Aussagen über steady state DCs treffen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC) sind von entscheidender Relevanz für das Zusammenspiel von angeborenem und erworbenem Immunsystem. Hierbei wird die Funktionalität dieses System unter anderem durch die Homöostase des DC-Netzwerkes gewährleistet, die sich auf einem schmalen Grat zwischen Immundefizienz und Autoimmunität bewegt. Vorarbeiten zeigten, dass sich der promiskuitive und G-Protein-gekoppelte FPR2 auf die Anzahl Dendritischer Zellen im lymphatischen Gewebe auswirkt. Dieser mögliche Einfluss auf die DC-Homöostase sollte hier untersucht werden.

Hierzu wurden die Zellzahl und Verteilung von DCs, sowie ihren Subpopulationen und Vorläufern in Knochenmark und Milz von C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen durchflusszytometrisch analysiert. Ebenso wurde das Apoptose-Verhalten der DCs sowie die intrazelluläre Menge des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 per Durchflusszytometrie untersucht. Außerdem wurden in Kultur generierte C57BL/6- und FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs in Bezug auf ihre Maturation und die Sezernierung von Zytokinen nach Stimulation mit LPS analysiert.

Höhere DC Zahlen in der Milz von FPR2<sup>-/-</sup>-Mäusen, wie in den vorherigen Versuchen, konnten nicht gezeigt werden, jedoch wurden veränderte prozentuale Anteile von DC-Subpopulationen beobachtet. Die FPR2<sup>-/-</sup>-DCs in der Milz zeigten ein besseres Überleben und höhere intrazelluläre Mengen des antiapoptotischen Proteins Bcl-2. Die FPR2<sup>-/-</sup>-BMDCs sezernierten nach Stimulation mit LPS signifikant geringere Konzentrationen des anti-apoptotischen Zytokins IL-10. Der FPR2 zeigt also einen Einfluss auf die Apoptose der Dendritischen Zellen sowie auf ihre anti-inflammatorische Funktion. Zur abschließenden Klärung seines Einflusses auf die DC-Homöostase sind jedoch noch weitere Untersuchungen angezeigt.

## 6 Referenzen

- ADOLFSSON, J., MÅNSSON, R., BUZA-VIDAS, N., HULTQUIST, A., LIUBA, K., JENSEN, C. T., BRYDER, D., YANG, L., BORGE, O.-J., THOREN, L. A. M., ANDERSON, K., SITNICKA, E., SASAKI, Y., SIGVARDSSON, M. & JACOBSEN, S. E. W. 2005. Identification of Flt3<sup>+</sup> Lympho-Myeloid Stem Cells Lacking Erythro-Megakaryocytic Potential. *Cell*, 121, 295-306.
- AKASHI, K., TRAVER, D., MIYAMOTO, T. & WEISSMAN, I. L. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404, 193-197.
- ALLAN, R. S., WAITHMAN, J., BEDOUI, S., JONES, C. M., VILLADANGOS, J. A., ZHAN, Y., LEW, A. M., SHORTMAN, K., HEATH, W. R. & CARBONE, F. R. 2006. Migratory Dendritic Cells Transfer Antigen to a Lymph Node-Resident Dendritic Cell Population for Efficient CTL Priming. *Immunity*, 25, 153-162.
- ANNACKER, O., COOMBES, J. L., MALMSTROM, V., UHLIG, H. H., BOURNE, T., JOHANSSON-LINDBOM, B., AGACE, W. W., PARKER, C. M. & POWRIE, F. 2005. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *Journal of Experimental Medicine*, 202, 1051-1061.
- APETOH, L., QUINTANA, F. J., POT, C., JOLLER, N., XIAO, S., KUMAR, D., BURNS, E. J., SHERR, D. H., WEINER, H. L. & KUCHROO, V. K. 2010. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nature Immunology*, 11, 854-861.
- ARDOUIN, L., LUCHE, H., CHELBI, R., CARPENTIER, S., SHAWKET, A., MONTANANA SANCHIS, F., SANTA MARIA, C., GRENOT, P., ALEXANDRE, Y., GRÉGOIRE, C., FRIES, A., VU MANH, T.-P., TAMOUTOUNOUR, S., CROZAT, K., TOMASELLO, E., JORQUERA, A., FOSSUM, E., BOGEN, B., AZUKIZAWA, H., BAJENOFF, M., HENRI, S., DALOD, M. & MALISSEN, B. 2016. Broad and Largely Concordant

- Molecular Changes Characterize Tolerogenic and Immunogenic Dendritic Cell Maturation in Thymus and Periphery. *Immunity*, 45, 305-318.
- ARMBRUSTER, N. S., RICHARDSON, J. R., KLENK, J., GÜNTER, M. & AUTENRIETH, S. E. unveröffentlichte Ergebnisse.
- ASSELIN-PATUREL, C., BOONSTRA, A., DALOD, M., DURAND, I., YESSAAD, N., DEZUTTER-DAMBUYANT, C., VICARI, A., O'GARRA, A., BIRON, C., BRIÈRE, F. & TRINCHIERI, G. 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nature Immunology*, 2, 1144-1150.
- ASSELIN-PATUREL, C., BRIZARD, G., PIN, J.-J., BRIÈRE, F. & TRINCHIERI, G. 2003. Mouse Strain Differences in Plasmacytoid Dendritic Cell Frequency and Function Revealed by a Novel Monoclonal Antibody. *The Journal of Immunology*, 171, 6466-6477.
- AUDIGER, C., RAHMAN, M. J., YUN, T. J., TARBELL, K. V. & LESAGE, S. 2017. The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance. *J Immunol*, 198, 2223-2231.
- AUFFRAY, C., FOGG, D. K., NARNI-MANCINELLI, E., SENECHAL, B., TROUILLET, C., SAEDERUP, N., LEEMPUT, J., BIGOT, K., CAMPISI, L., ABITBOL, M., MOLINA, T., CHARO, I., HUME, D. A., CUMANO, A., LAUVAU, G. & GEISSMANN, F. 2009. CX3CR1<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>+</sup> common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 206, 595-606.
- BACHEM, A., HARTUNG, E., GÜTTLER, S., MORA, A., ZHOU, X., HEGEMANN, A., PLANTINGA, M., MAZZINI, E., STOITZNER, P., GURKA, S., HENN, V., MAGES, H. W. & KROCZEK, R. A. 2012. Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation. *Frontiers in Immunology*, 3.
- BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBECQUE, S., LIU, Y. J., PULENDRAN, B. & PALUCKA, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 18, 767-811.
- BARCET, W., KRUG, A., CELLA, M., NEWBY, C., FISCHER, J. A. A., DZIOBEK, A., PEKOSZ, A. & COLONNA, M. 2005. Dendritic cells respond to influenza virus through TLR7- and PKR-independent pathways. *European Journal of Immunology*, 35, 236-242.
- BEDOUI, S., WHITNEY, P. G., WAITHMAN, J., EIDSMO, L., WAKIM, L., CAMINSCHI, I., ALLAN, R. S., WOJTASIAK, M., SHORTMAN, K., CARBONE, F. R., BROOKS, A. G. & HEATH, W. R. 2009. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103<sup>+</sup> dendritic cells. *Nature Immunology*, 10, 488-495.
- BELZ, G. T., BEHRENS, G. M. N., SMITH, C. M., MILLER, J. F. A. P., JONES, C., LEJON, K., FATHMAN, C. G., MUELLER, S. N., SHORTMAN, K., CARBONE, F. R. & HEATH, W. R. 2002. The CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Dendritic Cell Is Responsible for Inducing Peripheral Self-Tolerance to Tissue-associated Antigens. *Journal of Experimental Medicine*, 196, 1099-1104.
- BELZ, G. T., SMITH, C. M., EICHNER, D., SHORTMAN, K., KARUPIAH, G., CARBONE, F. R. & HEATH, W. R. 2004. Cutting Edge: Conventional

- CD8 $\alpha$ +Dendritic Cells Are Generally Involved in Priming CTL Immunity to Viruses. *The Journal of Immunology*, 172, 1996-2000.
- BERGSBAKEN, T., FINK, S. L. & COOKSON, B. T. 2009. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 99-109.
- BJÖRCK, P. 2001. Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood*, 98, 3520-3526.
- BOGUNOVIC, M., GINHOUX, F., HELFT, J., SHANG, L., HASHIMOTO, D., GRETER, M., LIU, K., JAKUBZICK, C., INGERSOLL, M. A., LEBOEUF, M., STANLEY, E. R., NUSSENZWEIG, M., LIRA, S. A., RANDOLPH, G. J. & MERAD, M. 2009. Origin of the Lamina Propria Dendritic Cell Network. *Immunity*, 31, 513-525.
- BONASIO, R., SCIMONE, M. L., SCHAERLI, P., GRABIE, N., LICHTMAN, A. H. & VON ANDRIAN, U. H. 2006. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nature Immunology*, 7, 1092-1100.
- BOONSTRA, A., ASSELIN-PATUREL, C., GILLIET, M., CRAIN, C., TRINCHIERI, G., LIU, Y.-J. & O'GARRA, A. 2003. Flexibility of Mouse Classical and Plasmacytoid-derived Dendritic Cells in Directing T Helper Type 1 and 2 Cell Development. *Journal of Experimental Medicine*, 197, 101-109.
- BORKOWSKI, T. A., LETTERIO, J. J., FARR, A. G. & UDEY, M. C. 1996. A Role for Endogenous Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 in Langerhans Cell Biology: The Skin of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Null Mice Is Devoid of Epidermal Langerhans Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 184, 2417-2422.
- CAIN, K., BRATTON, S. B. & COHEN, G. M. 2002. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, 84, 203-14.
- CANNON, W. B. 1926. Physiological regulation of normal states: some tentative postulates concerning biological homeostatics. *Ses Amis, ses Colleges, ses Eleves*.
- CARRINGTON, E. M., ZHAN, Y., BRADY, J. L., ZHANG, J.-G., SUTHERLAND, R. M., ANSTEE, N. S., SCHENK, R. L., VIKSTROM, I. B., DELCONTE, R. B., SEGAL, D., HUNTINGTON, N. D., BOUILLET, P., TARLINTON, D. M., HUANG, D. C., STRASSER, A., CORY, S., HEROLD, M. J. & LEW, A. M. 2017. Anti-apoptotic proteins BCL-2, MCL-1 and A1 summate collectively to maintain survival of immune cell populations both in vitro and in vivo. *Cell Death & Differentiation*, 24, 878-888.
- CASCINO, I., FIUCCI, G., PAPOFF, G. & RUBERTI, G. 1995. Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *The Journal of Immunology*, 154, 2706-13.
- CELLA, M., ENGERING, A., PINET, V., PIETERS, J. & LANZAVECCHIA, A. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*, 388, 782-7.
- CEPEK, K. L., SHAW, S. K., PARKER, C. M., RUSSELL, G. J., MORROW, J. S., RIMM, D. L. & BRENNER, M. B. 1994. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the  $\alpha$ E $\beta$ 7 integrin. *Nature*, 372, 190-193.

- CHEN, K., LE, Y., LIU, Y., GONG, W., YING, G., HUANG, J., YOSHIMURA, T., TESSAROLLO, L. & WANG, J. M. 2010. A critical role for the g protein-coupled receptor mFPR2 in airway inflammation and immune responses. *The Journal of Immunology*, 184, 3331-5.
- CHEN, K., SINGH, V. K., TANG, P., BAO, Z., HE, T., XIANG, Y., GONG, W., YOSHIMURA, T., LE, Y., TESSAROLLO, L., CHEN, X. & WANG, J. M. 2018. Deficiency in Fpr2 results in reduced numbers of Lin-cKit+Sca1+myeloid progenitor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 293, 13452-13463.
- CHEN, K., XIANG, Y., HUANG, J., GONG, W., YOSHIMURA, T., JIANG, Q., TESSAROLLO, L., LE, Y. & WANG, J. M. 2014. The formylpeptide receptor 2 (Fpr2) and its endogenous ligand cathelin-related antimicrobial peptide (CRAMP) promote dendritic cell maturation. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 17553-63.
- CHEN, M., WANG, Y. H., WANG, Y., HUANG, L., SANDOVAL, H., LIU, Y. J. & WANG, J. 2006. Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science*, 311, 1160-4.
- CHIANG, N., SERHAN, C. N., DAHLÉN, S. E., DRAZEN, J. M., HAY, D. W., ROVATI, G. E., SHIMIZU, T., YOKOMIZO, T. & BRINK, C. 2006. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. *Pharmacological Reviews*, 58, 463-87.
- CHO, Y., CHALLA, S., MOQUIN, D., GENGA, R., RAY, T. D., GUILDFORD, M. & CHAN, F. K.-M. 2009. Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell*, 137, 1112-1123.
- COQUET, J. M., RIBOT, J. C., BAŁAŁA, N., MIDDENDORP, S., VAN DER HORST, G., XIAO, Y., NEVES, J. F., FONSECA-PEREIRA, D., JACOBS, H., PENNINGTON, D. J., SILVA-SANTOS, B. & BORST, J. 2013. Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla promote CD4+Foxp3+ regulatory T cell development via the CD27-CD70 pathway. *Journal of Experimental Medicine*, 210, 715-728.
- CZABOTAR, P. E., LESSENE, G., STRASSER, A. & ADAMS, J. M. 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 49-63.
- D'AMICO, A. & WU, L. 2003. The Early Progenitors of Mouse Dendritic Cells and Plasmacytoid Predendritic Cells Are within the Bone Marrow Hemopoietic Precursors Expressing Flt3. *Journal of Experimental Medicine*, 198, 293-303.
- D'ARCY, M. S. 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43, 582-592.
- DALOD, M., SALAZAR-MATHER, T. P., MALMGAARD, L., LEWIS, C., ASSELIN-PATUREL, C., BRIÈRE, F., TRINCHIERI, G. & BIRON, C. A. 2002. Interferon  $\alpha/\beta$  and Interleukin 12 Responses to Viral Infections. *Journal of Experimental Medicine*, 195, 517-528.
- DEGTEREV, A., HUANG, Z., BOYCE, M., LI, Y., JAGTAP, P., MIZUSHIMA, N., CUNY, G. D., MITCHISON, T. J., MOSKOWITZ, M. A. & YUAN, J. 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*, 1, 112-9.

- DEN HAAN, J. M., LEHAR, S. M. & BEVAN, M. J. 2000. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 192, 1685-96.
- DEVOSSE, T., GUILLABERT, A., D'HAENE, N., BERTON, A., DE NADAI, P., NOEL, S., BRAIT, M., FRANSSSEN, J.-D., SOZZANI, S., SALMON, I. & PARMENTIER, M. 2009. Formyl Peptide Receptor-Like 2 Is Expressed and Functional in Plasmacytoid Dendritic Cells, Tissue-Specific Macrophage Subpopulations, and Eosinophils. *The Journal of Immunology*, 182, 4974-4984.
- DOLCH, A., KUNZ, S., DORN, B., ALESSANDRINI, F., MÜLLER, W., JACK, R. S., MARTIN, S. F., ROERS, A. & JAKOB, T. 2019. IL-10 signaling in dendritic cells is required for tolerance induction in a murine model of allergic airway inflammation. *European Journal of Immunology*, 49, 302-312.
- DUFTON, N., HANNON, R., BRANCALEONE, V., DALLI, J., PATEL, H. B., GRAY, M., D'ACQUISTO, F., BUCKINGHAM, J. C., PERRETTI, M. & FLOWER, R. J. 2010. Anti-inflammatory role of the murine formyl-peptide receptor 2: ligand-specific effects on leukocyte responses and experimental inflammation. *The Journal of Immunology*, 184, 2611-2619.
- DURIANCIK, D. M. & HOAG, K. A. 2009. The identification and enumeration of dendritic cell populations from individual mouse spleen and Peyer's patches using flow cytometric analysis. *Cytometry Part A*, 75A, 951-959.
- EDINGER, A. L. & THOMPSON, C. B. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16, 663-669.
- EDWARDS, A. D., DIEBOLD, S. S., SLACK, E. M., TOMIZAWA, H., HEMMI, H., KAISHO, T., AKIRA, S. & REIS E SOUSA, C. 2003. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *European Journal of Immunology*, 33, 827-33.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.
- ERDURAN, E., TEKELIOGLU, Y., GEDIK, Y., BEKTAŞ, İ. & HACISALIHOGLU, S. 2004. IN VITRO DETERMINATION OF THE APOPTOTIC EFFECT OF HEPARIN ON LYMPHOBLASTS USING DNA ANALYSIS AND MEASUREMENTS OF Fas AND Bcl-2 PROTEINS BY FLOW CYTOMETRY. *Pediatric Hematology and Oncology*, 21, 383-391.
- FADOK, V. A., VOELKER, D. R., CAMPBELL, P. A., COHEN, J. J., BRATTON, D. L. & HENSON, P. M. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology*, 148, 2207-16.
- FERLAZZO, V., D'AGOSTINO, P., MILANO, S., CARUSO, R., FEO, S., CILLARI, E. & PARENTE, L. 2003. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. *International Immunopharmacology*, 3, 1363-1369.
- FESTJENS, N., VANDEN BERGHE, T. & VANDENABEELE, P. 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1757, 1371-87.

- FOGG, D. K. 2006. A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science*, 311, 83-87.
- FURLANETO, C. J. & CAMPA, A. 2000. A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-8 by human blood neutrophil. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268, 405-8.
- GANDHI, R., KUMAR, D., BURNS, E. J., NADEAU, M., DAKE, B., LARONI, A., KOZORIZ, D., WEINER, H. L. & QUINTANA, F. J. 2010. Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3+ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 11, 846-853.
- GAO, J.-L., LEE, E. J. & MURPHY, P. M. 1999. Impaired Antibacterial Host Defense in Mice Lacking the N-formylpeptide Receptor. *Journal of Experimental Medicine*, 189, 657-662.
- GAO, J. L., GUILLABERT, A., HU, J., LE, Y., URIZAR, E., SELIGMAN, E., FANG, K. J., YUAN, X., IMBAULT, V., COMMUNI, D., WANG, J. M., PARMENTIER, M., MURPHY, P. M. & MIGEOTTE, I. 2007. F2L, a Peptide Derived from Heme-Binding Protein, Chemoattracts Mouse Neutrophils by Specifically Activating Fpr2, the Low-Affinity N-Formylpeptide Receptor. *The Journal of Immunology*, 178, 1450-1456.
- GEHRIE, E., VAN DER TOUW, W., BROMBERG, J. S. & OCHANDO, J. C. 2010. Plasmacytoid Dendritic Cells in Tolerance. Humana Press.
- GESKE, F. J., LIEBERMAN, R., STRANGE, R. & GERSCHENSON, L. E. 2001. Early stages of p53-induced apoptosis are reversible. *Cell Death & Differentiation*, 8, 182-191.
- GEURTSVANKESSEL, C. H., WILLART, M. A. M., VAN RIJT, L. S., MUSKENS, F., KOOL, M., BAAS, C., THIELEMANS, K., BENNETT, C., CLAUSEN, B. R. E., HOOGSTEDEN, H. C., OSTERHAUS, A. D. M. E., RIMMELZWAAN, G. F. & LAMBRECHT, B. N. 2008. Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 205, 1621-1634.
- GIEBELER, A., STREETZ, K. L., SOEHNLEIN, O., NEUMANN, U., WANG, J. M. & BRANDENBURG, L. O. 2014. Deficiency of formyl peptide receptor 1 and 2 is associated with increased inflammation and enhanced liver injury after LPS-stimulation. *PLoS One*, 9, e100522.
- GINHOUX, F., LIU, K., HELFT, J., BOGUNOVIC, M., GRETER, M., HASHIMOTO, D., PRICE, J., YIN, N., BROMBERG, J., LIRA, S. A., STANLEY, E. R., NUSSENZWEIG, M. & MERAD, M. 2009. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *Journal of Experimental Medicine*, 206, 3115-3130.
- GOLSTEIN, P. 1998. Cell death in us and others. *Science*, 281, 1283.
- GORDON, S. & TAYLOR, P. R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, 5, 953-64.
- GRETER, M., HELFT, J., CHOW, A., HASHIMOTO, D., MORTHA, A., AGUDO-CANTERO, J., BOGUNOVIC, M., EMMANUEL, MILLER, J., LEBOEUF, M., LU, G., ALOMAN, C., BRIAN, JEFFREY, XIONG, H., GWENDALYN, JERRY, PAUL & MERAD, M. 2012. GM-CSF Controls Nonlymphoid

- Tissue Dendritic Cell Homeostasis but Is Dispensable for the Differentiation of Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity*, 36, 1031-1046.
- GREWAL, I. S., XU, J. & FLAVELL, R. A. 1995. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature*, 378, 617-20.
- GROUARD, G., RISSOAN, M.-C., FILGUEIRA, L., DURAND, I., BANCHEREAU, J. & LIU, Y.-J. 1997. The Enigmatic Plasmacytoid T Cells Develop into Dendritic Cells with Interleukin (IL)-3 and CD40-Ligand. *Journal of Experimental Medicine*, 185, 1101-1112.
- GUILLIAMS, M., GINHOUX, F., JAKUBZICK, C., NAIK, S. H., ONAI, N., SCHRAML, B. U., SEGURA, E., TUSSIWAND, R. & YONA, S. 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews Immunology*, 14, 571-578.
- GUILLIAMS, M., MOVAHEDI, K., BOSSCHAERTS, T., VANDENDRIESSCHE, T., CHUAH, M. K., HÉRIN, M., ACOSTA-SANCHEZ, A., MA, L., MOSER, M., VAN GINDERACHTER, J. A., BRYNS, L., DE BAETSELIER, P. & BESCHIN, A. 2009. IL-10 Dampens TNF/Inducible Nitric Oxide Synthase-Producing Dendritic Cell-Mediated Pathogenicity during Parasitic Infection. *The Journal of Immunology*, 182, 1107-1118.
- GUO, X., ZHOU, Y., WU, T., ZHU, X., LAI, W. & WU, L. 2016. Generation of mouse and human dendritic cells in vitro. *Journal of Immunological Methods*, 432, 24-9.
- HARTT, J. K., BARISH, G., MURPHY, P. M. & GAO, J. L. 1999. N-formylpeptides induce two distinct concentration optima for mouse neutrophil chemotaxis by differential interaction with two N-formylpeptide receptor (FPR) subtypes. Molecular characterization of FPR2, a second mouse neutrophil FPR. *Journal of Experimental Medicine*, 190, 741-7.
- HATHCOCK, K. S., LASZLO, G., DICKLER, H. B., BRADSHAW, J., LINSLEY, P. & HODES, R. J. 1993. Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation. *Science*, 262, 905-7.
- HAWIGER, D., INABA, K., DORSETT, Y., GUO, M., MAHNKE, K., RIVERA, M., RAVETCH, J. V., STEINMAN, R. M. & NUSSENZWEIG, M. C. 2001. Dendritic Cells Induce Peripheral T Cell Unresponsiveness under Steady State Conditions in Vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 194, 769-780.
- HAYASHI, F., SMITH, K. D., OZINSKY, A., HAWN, T. R., YI, E. C., GOODLETT, D. R., ENG, J. K., AKIRA, S., UNDERHILL, D. M. & ADEREM, A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410, 1099-1103.
- HE, H.-Q., LIAO, D., WANG, Z.-G., WANG, Z.-L., ZHOU, H.-C., WANG, M.-W. & YE, R. D. 2013. Functional Characterization of Three Mouse Formyl Peptide Receptors. *Molecular Pharmacology*, 83, 389-398.
- HE, R., SANG, H. & YE, R. D. 2003. Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. *Blood*, 101, 1572-81.
- HE, S., WANG, L., MIAO, L., WANG, T., DU, F., ZHAO, L. & WANG, X. 2009. Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- $\alpha$ . *Cell*, 137, 1100-1111.
- HELFT, J., BOTTCHEER, J., CHAKRAVARTY, P., ZELENAY, S., HUOTARI, J., SCHRAML, B. U., GOUBAU, D. & REIS E SOUSA, C. 2015. GM-CSF



- Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity*, 42, 1197-211.
- HELFT, J., GINHOUX, F., BOGUNOVIC, M. & MERAD, M. 2010. Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunological Reviews*, 234, 55-75.
- HEMMI, H., KAISHO, T., TAKEUCHI, O., SATO, S., SANJO, H., HOSHINO, K., HORIUCHI, T., TOMIZAWA, H., TAKEDA, K. & AKIRA, S. 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunology*, 3, 196-200.
- HENRI, S., VREMEC, D., KAMATH, A., WAITHMAN, J., WILLIAMS, S., BENOIST, C., BURNHAM, K., SAELAND, S., HANDMAN, E. & SHORTMAN, K. 2001. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *The Journal of Immunology*, 167, 741-8.
- HILDNER, K., EDELSON, B. T., PURTHA, W. E., DIAMOND, M., MATSUSHITA, H., KOHYAMA, M., CALDERON, B., SCHRAML, B. U., UNANUE, E. R., DIAMOND, M. S., SCHREIBER, R. D., MURPHY, T. L. & MURPHY, K. M. 2008. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science*, 322, 1097-100.
- HO, A. W., PRABHU, N., BETTS, R. J., GE, M. Q., DAI, X., HUTCHINSON, P. E., LEW, F. C., WONG, K. L., HANSON, B. J., MACARY, P. A. & KEMENY, D. M. 2011. Lung CD103+ dendritic cells efficiently transport influenza virus to the lymph node and load viral antigen onto MHC class I for presentation to CD8 T cells. *The Journal of Immunology*, 187, 6011-21.
- HOHL, T. M., RIVERA, A., LIPUMA, L., GALLEGOS, A., SHI, C., MACK, M. & PAMER, E. G. 2009. Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection. *Cell Host Microbe*, 6, 470-81.
- HOLZENBERGER, M., LENZNER, C., LENEUVE, P., ZAOUI, R., HAMARD, G., VAULONT, S. & BOUC, Y. L. 2000. Cre-mediated germline mosaicism: a method allowing rapid generation of several alleles of a target gene. *Nucleic Acids Res*, 28, E92.
- HUANG, F.-P., PLATT, N., WYKES, M., MAJOR, J. R., POWELL, T. J., JENKINS, C. D. & MACPHERSON, G. G. 2000. A Discrete Subpopulation of Dendritic Cells Transports Apoptotic Intestinal Epithelial Cells to T Cell Areas of Mesenteric Lymph Nodes. *Journal of Experimental Medicine*, 191, 435-444.
- HUGHES, P. D., BELZ, G. T., FORTNER, K. A., BUDD, R. C., STRASSER, A. & BOUILLET, P. 2008. Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity*, 28, 197-205.
- IKUTA, K. & WEISSMAN, I. L. 1992. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 1502-1506.
- INABA, K., INABA, M., NAITO, M. & STEINMAN, R. M. 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin

- organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 178, 479-88.
- INABA, K., INABA, M., ROMANI, N., AYA, H., DEGUCHI, M., IKEHARA, S., MURAMATSU, S. & STEINMAN, R. M. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Experimental Medicine*, 176, 1693-1702.
- INABA, K., SWIGGARD, W. J., INABA, M., MELTZER, J., MIRYZA, A., SASAGAWA, T., NUSSENZWEIG, M. C. & STEINMAN, R. U. 1995. Tissue Distribution of the DEC-205 Protein That Is Detected by the Monoclonal Antibody NLDC-145. *Cellular Immunology*, 163, 148-156.
- IWASAKI, A. & MEDZHITOV, R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 5, 987-995.
- IWASAKI, A. & MEDZHITOV, R. 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, 16, 343-353.
- JAENSSON, E., URONEN-HANSSON, H., PABST, O., EKSTEEN, B., TIAN, J., COOMBES, J. L., BERG, P.-L., DAVIDSSON, T., POWRIE, F., JOHANSSON-LINDBOM, B. & AGACE, W. W. 2008. Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *Journal of Experimental Medicine*, 205, 2139-2149.
- JAESCHKE, H. & LEMASTERS, J. J. 2003. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*, 125, 1246-57.
- JAKUBZICK, C., BOGUNOVIC, M., BONITO, A. J., KUAN, E. L., MERAD, M. & RANDOLPH, G. J. 2008. Lymph-migrating, tissue-derived dendritic cells are minor constituents within steady-state lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine*, 205, 2839-2850.
- JANEWAY, C. A., JR. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 54 Pt 1, 1-13.
- JIANG, W., SWIGGARD, W. J., HEUFLER, C., PENG, M., MIRZA, A., STEINMAN, R. M. & NUSSENZWEIG, M. C. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*, 375, 151-5.
- JOHANSSON-LINDBOM, B., SVENSSON, M., PABST, O., PALMQVIST, C., MARQUEZ, G., FÖRSTER, R. & AGACE, W. W. 2005. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *Journal of Experimental Medicine*, 202, 1063-1073.
- JONES, A., BOURQUE, J., KUEHM, L., OPEJIN, A., RYAN, GROSS, C. & HAWIGER, D. 2016. Immunomodulatory Functions of BTLA and HVEM Govern Induction of Extrathymic Regulatory T Cells and Tolerance by Dendritic Cells. *Immunity*, 45, 1066-1077.
- JORDAN, C. T. & LEMISCHKA, I. R. 1990. Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev*, 4, 220-32.
- KAMATH, A. T., POOLEY, J., O'KEEFFE, M. A., VREMEC, D., ZHAN, Y., LEW, A. M., D'AMICO, A., WU, L., TOUGH, D. F. & SHORTMAN, K. 2000. The

- Development, Maturation, and Turnover Rate of Mouse Spleen Dendritic Cell Populations. *The Journal of Immunology*, 165, 6762-6770.
- KANAKO, MICHELE, BOGUNOVIC, M., GRETER, M., LUCJA, NG, D., KLINAKIS, A., ISRAEL, JUNG, S., JENNIFER, IVAYLO, LIU, K., MERAD, M. & REIZIS, B. 2011. Notch2 Receptor Signaling Controls Functional Differentiation of Dendritic Cells in the Spleen and Intestine. *Immunity*, 35, 780-791.
- KARSUNKY, H., MERAD, M., COZZIO, A., WEISSMAN, I. L. & MANZ, M. G. 2003. Flt3 Ligand Regulates Dendritic Cell Development from Flt3+ Lymphoid and Myeloid-committed Progenitors to Flt3+ Dendritic Cells In Vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 198, 305-313.
- KELSALL, B. L., STÜBER, E., NEURATH, M. & STROBER, W. 1996. Interleukin-12 production by dendritic cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T-cell responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 795, 116-26.
- KERR, J. F. R., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239-257.
- KLEBANOFF, C. A., SPENCER, S. P., TORABI-PARIZI, P., GRAINGER, J. R., ROYCHOUDHURI, R., JI, Y., SUKUMAR, M., MURANSKI, P., SCOTT, C. D., HALL, J. A., FERREYRA, G. A., LEONARDI, A. J., BORMAN, Z. A., WANG, J., PALMER, D. C., WILHELM, C., CAI, R., SUN, J., NAPOLI, J. L., DANNER, R. L., GATTINONI, L., BELKAID, Y. & RESTIFO, N. P. 2013. Retinoic acid controls the homeostasis of pre-cDC-derived splenic and intestinal dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 210, 1961-76.
- KLEIN, L., KYEWSKI, B., ALLEN, P. M. & HOGQUIST, K. A. 2014. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nature Reviews Immunology*, 14, 377-391.
- KLUCK, R. M., BOSSY-WETZEL, E., GREEN, D. R. & NEWMAYER, D. D. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 275, 1132-6.
- KONDO, M., SCHERER, D. C., KING, A. G., MANZ, M. G. & WEISSMAN, I. L. 2001. Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Current Opinion in Genetics and Development*, 11, 520-6.
- KONDO, M., WEISSMAN, I. L. & AKASHI, K. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, 91, 661-72.
- KOOL, M., SOULLIÉ, T., VAN NIMWEGEN, M., WILLART, M. A. M., MUSKENS, F., JUNG, S., HOOGSTEDEN, H. C., HAMMAD, H. & LAMBRECHT, B. N. 2008. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 205, 869-882.
- KORN, T., BETTELLI, E., OUKKA, M. & KUCHROO, V. K. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*, 27, 485-517.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDENABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H., BLAGOSKLONNY, M. V., EL-DEIRY, W. S., GOLSTEIN, P., GREEN, D. R., HENGARTNER, M., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LIPTON, S. A., MALORNI, W., NUÑEZ, G., PETER, M. E., TSCHOPP, J., YUAN, J., PIACENTINI, M., ZHIVOTOVSKY, B. &

- MELINO, G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation*, 16, 3-11.
- KRONIN, V. 1997. Are CD8+ dendritic cells (DC) veto cells? The role of CD8 on DC in DC development and in the regulation of CD4 and CD8 T cell responses. *International Immunology*, 9, 1061-1064.
- KRUG, A., FRENCH, A. R., BARCHET, W., FISCHER, J. A. A., DZIOONEK, A., PINGEL, J. T., ORIHUELA, M. M., AKIRA, S., YOKOYAMA, W. M. & COLONNA, M. 2004. TLR9-Dependent Recognition of MCMV by IPC and DC Generates Coordinated Cytokine Responses that Activate Antiviral NK Cell Function. *Immunity*, 21, 107-119.
- LAMBRECHT, B. 1996. THE DENDRITIC CELL: ITS POTENT ROLE IN THE RESPIRATORY IMMUNE RESPONSE. *Cell Biology International*, 20, 111-120.
- LAMBRECHT, B. N., SALOMON, B., KLATZMANN, D. & PAUWELS, R. A. 1998. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *The Journal of Immunology*, 160, 4090-7.
- LANGERHANS, P. 1868. Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin*, 44, 325-337.
- LANGLET, C., TAMOUTOUNOUR, S., HENRI, S., LUCHE, H., ARDOUIN, L., GRÉGOIRE, C., MALISSEN, B. & GUILLIAMS, M. 2012. CD64 Expression Distinguishes Monocyte-Derived and Conventional Dendritic Cells and Reveals Their Distinct Role during Intramuscular Immunization. *The Journal of Immunology*, 188, 1751-1760.
- LARSEN, C. P., RITCHIE, S. C., PEARSON, T. C., LINSLEY, P. S. & LOWRY, R. P. 1992. Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. *Journal of Experimental Medicine*, 176, 1215-20.
- LAUBER, K., BOHN, E., KRÖBER, S. M., XIAO, Y.-J., BLUMENTHAL, S. G., LINDEMANN, R. K., MARINI, P., WIEDIG, C., ZOBYWALSKI, A., BAKSH, S., XU, Y., AUTENRIETH, I. B., SCHULZE-OSTHOFF, K., BELKA, C., STUHLER, G. & WESSELBORG, S. 2003. Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal. *Cell*, 113, 717-730.
- LAVRIK, I. N. 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 2665-2672.
- LE BORGNE, M., ETCHART, N., GOUBIER, A., LIRA, S. A., SIRARD, J. C., VAN ROOIJEN, N., CAUX, C., AÏT-YAHIA, S., VICARI, A., KAISERLIAN, D. & DUBOIS, B. 2006. Dendritic Cells Rapidly Recruited into Epithelial Tissues via CCR6/CCL20 Are Responsible for CD8+ T Cell Crosspriming In Vivo. *Immunity*, 24, 191-201.
- LE, Y., YE, R. D., GONG, W., LI, J., IRIBARREN, P. & WANG, J. M. 2005. Identification of functional domains in the formyl peptide receptor-like 1 for agonist-induced cell chemotaxis. *The FEBS Journal*, 272, 769-78.

- LEGGE, K. L. & BRACIALE, T. J. 2003. Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. *Immunity*, 18, 265-77.
- LEÓN, B. & ARDAVÍN, C. 2008. Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunology & Cell Biology*, 86, 320-324.
- LEÓN, B., LÓPEZ-BRAVO, M. & ARDAVÍN, C. 2007. Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against Leishmania. *Immunity*, 26, 519-531.
- LEVINE, B. & DERETIC, V. 2007. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 7, 767-777.
- LEVY, B. D., DE SANCTIS, G. T., DEVCHAND, P. R., KIM, E., ACKERMAN, K., SCHMIDT, B. A., SZCZEKLIK, W., DRAZEN, J. M. & SERHAN, C. N. 2002. Multi-pronged inhibition of airway hyper-responsiveness and inflammation by lipoxin A4. *Nature Medicine*, 8, 1018-1023.
- LI, C. & JOHNSON, G. 1995. Murine hematopoietic stem and progenitor cells: I. Enrichment and biologic characterization. *Blood*, 85, 1472-1479.
- LIN, Y.-L., CHEN, S.-H. & WANG, J.-Y. 2016. Critical role of IL-6 in dendritic cell-induced allergic inflammation of asthma. *Journal of Molecular Medicine*, 94, 51-59.
- LISTON, A., NUTSCH, K. M., FARR, A. G., LUND, J. M., RASMUSSEN, J. P., KONI, P. A. & RUDENSKY, A. Y. 2008. Differentiation of regulatory Foxp3+ T cells in the thymic cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 11903-11908.
- LIU, K., VICTORA, G. D., SCHWICKERT, T. A., GUERMONPREZ, P., MEREDITH, M. M., YAO, K., CHU, F. F., RANDOLPH, G. J., RUDENSKY, A. Y. & NUSSENZWEIG, M. 2009. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science*, 324, 392-7.
- LIU, K., WASKOW, C., LIU, X., YAO, K., HOH, J. & NUSSENZWEIG, M. 2007. Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nature Immunology*, 8, 578-583.
- LIU, M., CHEN, K., YOSHIMURA, T., LIU, Y., GONG, W., WANG, A., GAO, J.-L., MURPHY, P. M. & WANG, J. M. 2012. Formylpeptide receptors are critical for rapid neutrophil mobilization in host defense against *Listeria monocytogenes*. *Scientific Reports*, 2.
- LUDWIG, L. M., MAXCY, K. L. & LABELLE, J. L. 2019. Flow Cytometry-Based Detection and Analysis of BCL-2 Family Proteins and Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization (MOMP). Springer New York.
- LUTZ, M. B., KUKUTSCH, N., OGILVIE, A. L., RÖSSNER, S., KOCH, F., ROMANI, N. & SCHULER, G. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods*, 223, 77-92.
- LUTZ, M. B., STROBL, H., SCHULER, G. & ROMANI, N. 2017. GM-CSF Monocyte-Derived Cells and Langerhans Cells As Part of the Dendritic Cell Family. *Frontiers in Immunology*, 8, 1388.
- MACATONIA, S. E., HOSKEN, N. A., LITTON, M., VIEIRA, P., HSIEH, C. S., CULPEPPER, J. A., WYSOCKA, M., TRINCHIERI, G., MURPHY, K. M. & O'GARRA, A. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the

- development of Th1 cells from naive CD4<sup>+</sup> T cells. *The Journal of Immunology*, 154, 5071-9.
- MACATONIA, S. E., KNIGHT, S. C., EDWARDS, A. J., GRIFFITHS, S. & FRYER, P. 1987. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *Journal of Experimental Medicine*, 166, 1654-1667.
- MACHADO, M. G., TAVARES, L. P., SOUZA, G. V. S., QUEIROZ-JUNIOR, C. M., ASCENÇÃO, F. R., LOPES, M. E., GARCIA, C. C., MENEZES, G. B., PERRETTI, M., RUSSO, R. C., TEIXEIRA, M. M. & SOUSA, L. P. 2020. The Annexin A1/FPR2 pathway controls the inflammatory response and bacterial dissemination in experimental pneumococcal pneumonia. *The FASEB Journal*, 34, 2749-2764.
- MACPHERSON, G. G., JENKINS, C. D., STEIN, M. J. & EDWARDS, C. 1995. Endotoxin-mediated dendritic cell release from the intestine. Characterization of released dendritic cells and TNF dependence. *The Journal of Immunology*, 154, 1317-22.
- MAJNO, G. & JORIS, I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology*, 146, 3-15.
- MALISSEN, B., TAMOUTOUNOUR, S. & HENRI, S. 2014. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nature Reviews Immunology*, 14, 417-428.
- MAN, S. M., KARKI, R. & KANNEGANTI, T.-D. 2017. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunological Reviews*, 277, 61-75.
- MANZ, M. G., TRAVER, D., MIYAMOTO, T., WEISSMAN, I. L. & AKASHI, K. 2001. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood*, 97, 3333-3341.
- MARTÍN, P., DEL HOYO, G. M. N., ANJUÈRE, F., ARIAS, C. F. N., VARGAS, H. C. H. N., FERNÁNDEZ-L, A., PARRILLAS, V. N. & ARDAVIN, C. 2002. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> B220<sup>+</sup> dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood*, 100, 383-390.
- MARX, J. 2006. Immunology. Foiled dendritic cell suicide may lead to autoimmunity. *Science*, 311, 1086.
- MATSUE, H. & TAKASHIMA, A. 1999. Apoptosis in dendritic cell biology. *Journal of Dermatological Science*, 20, 159-171.
- MATZINGER, P. 1994. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annual Review of Immunology*, 12, 991-1045.
- MCDONNELL, T. J., DEANE, N., PLATT, F. M., NUNEZ, G., JAEGER, U., MCKEARN, J. P. & KORSMEYER, S. J. 1989. bcl-2-Immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*, 57, 79-88.
- MCLELLAN, A. D., KAPP, M., EGGERT, A., LINDEN, C., BOMMARDT, U., BRÖCKER, E.-B., KÄMMERER, U. & KÄMPGEN, E. 2002. Anatomic location and T-cell stimulatory functions of mouse dendritic cell subsets defined by CD4 and CD8 expression. *Blood*, 99, 2084-2093.

- MERAD, M., GINHOUX, F. & COLLIN, M. 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 8, 935-947.
- MERAD, M. & MANZ, M. G. 2009. Dendritic cell homeostasis. *Blood*, 113, 3418-3427.
- MERAD, M., SATHE, P., HELFT, J., MILLER, J. & MORTHA, A. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual Review of Immunology*, 31, 563-604.
- MIGA, A. J., MASTERS, S. R., DURELL, B. G., GONZALEZ, M., JENKINS, M. K., MALISZEWSKI, C., KIKUTANI, H., WADE, W. F. & NOELLE, R. J. 2001. Dendritic cell longevity and T cell persistence is controlled by CD154-CD40 interactions. *European Journal of Immunology*, 31, 959-65.
- MIGEOTTE, I., COMMUNI, D. & PARMENTIER, M. 2006. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 17, 501-19.
- MILDNER, A. & JUNG, S. 2014. Development and Function of Dendritic Cell Subsets. *Immunity*, 40, 642-656.
- MILLER, J. C., BROWN, B. D., SHAY, T., GAUTIER, E. L., JOJIC, V., COHAIN, A., PANDEY, G., LEBOEUF, M., ELPEK, K. G., HELFT, J., HASHIMOTO, D., CHOW, A., PRICE, J., GRETER, M., BOGUNOVIC, M., BELLEMARE-PELLETIER, A., FRENETTE, P. S., RANDOLPH, G. J., TURLEY, S. J. & MERAD, M. 2012. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nature Immunology*, 13, 888-899.
- MIZUSHIMA, N., LEVINE, B., CUERVO, A. M. & KLIONSKY, D. J. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451, 1069-1075.
- MOORE, K. W., DE WAAL MALEFYT, R., COFFMAN, R. L. & O'GARRA, A. 2001. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annual Review of Immunology*, 19, 683-765.
- MOREL, Y., TRUNEH, A., SWEET, R. W., OLIVE, D. & COSTELLO, R. T. 2001. The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD40 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity. *The Journal of Immunology*, 167, 2479-86.
- MUCIDA, D., PARK, Y., KIM, G., TUROVSKAYA, O., SCOTT, I., KRONENBERG, M. & CHEROUTRE, H. 2007. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, 317, 256-60.
- NAGATA, S. 1997. Apoptosis by Death Factor. *Cell*, 88, 355-365.
- NAGATA, S., HANAYAMA, R. & KAWANE, K. 2010. Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell*, 140, 619-630.
- NAIK, S. H., SATHE, P., PARK, H. Y., METCALF, D., PROIETTO, A. I., DAKIC, A., CAROTTA, S., O'KEEFFE, M., BAHLO, M., PAPENFUSS, A., KWAK, J. Y., WU, L. & SHORTMAN, K. 2007. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nature Immunology*, 8, 1217-26.

- NAKANO, H., YANAGITA, M. & GUNN, M. D. 2001. Cd11c+B220+Gr-1+ Cells in Mouse Lymph Nodes and Spleen Display Characteristics of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 194, 1171-1178.
- NIESS, J. H. 2005. CX3CR1-Mediated Dendritic Cell Access to the Intestinal Lumen and Bacterial Clearance. *Science*, 307, 254-258.
- NOFORA, A. & BROCKER, T. 2002. Bcl-2 Controls Dendritic Cell Longevity In Vivo. *The Journal of Immunology*, 169, 3006-3014.
- NUSSENZWEIG, M., STEINMAN, R., UNKELESS, J., WITMER, M., GUTCHINOV, B. & COHN, Z. 1981. Studies of the cell surface of mouse dendritic cells and other leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 154, 168-187.
- O'KEEFFE, M., HOCHREIN, H., VREMEC, D., CAMINSCHI, I., MILLER, J. L., ANDERS, E. M., WU, L., LAHOUD, M. H., HENRI, S., SCOTT, B., HERTZOG, P., TATARCZUCH, L. & SHORTMAN, K. 2002. Mouse Plasmacytoid Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 196, 1307-1319.
- O'KEEFFE, M., HOCHREIN, H., VREMEC, D., SCOTT, B., HERTZOG, P., TATARCZUCH, L. & SHORTMAN, K. 2003. Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors. *Blood*, 101, 1453-1459.
- OH, J., KIM, S. H., AHN, S. & LEE, C. E. 2012. Suppressors of cytokine signaling promote Fas-induced apoptosis through downregulation of NF- $\kappa$ B and mitochondrial Bfl-1 in leukemic T cells. *The Journal of Immunology*, 189, 5561-71.
- OHL, L., MOHAUPT, M., CZELOTH, N., HINTZEN, G., KIAFARD, Z., ZWIRNER, J., BLANKENSTEIN, T., HENNING, G. & FÖRSTER, R. 2004. CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions. *Immunity*, 21, 279-288.
- 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. *Journal of Experimental Medicine*, 206, 549-59.
- ONAI, N., KURABAYASHI, K., HOSOI-AMAIKE, M., TOYAMA-SORIMACHI, N., MATSUSHIMA, K., INABA, K. & OHTEKI, T. 2013. A Clonogenic Progenitor with Prominent Plasmacytoid Dendritic Cell Developmental Potential. *Immunity*, 38, 943-957.
- ONAI, N., OBATA-ONAI, A., SCHMID, M. A., OHTEKI, T., JARROSSAY, D. & MANZ, M. G. 2007. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nature Immunology*, 8, 1207-16.
- ONAI, N., OBATA-ONAI, A., TUSSIWAND, R., LANZAVECCHIA, A. & MANZ, M. G. 2006. Activation of the Flt3 signal transduction cascade rescues and enhances type I interferon-producing and dendritic cell development. *Journal of Experimental Medicine*, 203, 227-238.
- ONISHI, H., KUROKI, H., MATSUMOTO, K., BABA, E., SASAKI, N., KUGA, H., TANAKA, M., KATANO, M. & MORISAKI, T. 2004. Monocyte-derived dendritic cells that capture dead tumor cells secrete IL-12 and TNF-?



- through IL-12/TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B autocrine loop. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 53, 1093-1100.
- PERRETTI, M., CHIANG, N., LA, M., FIERRO, I. M., MARULLO, S., GETTING, S. J., SOLITO, E. & SERHAN, C. N. 2002. Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor. *Nature Medicine*, 8, 1296-1302.
- PIERRE, P., TURLEY, S. J., GATTI, E., HULL, M., MELTZER, J., MIRZA, A., INABA, K., STEINMAN, R. M. & MELLMAN, I. 1997. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature*, 388, 787-792.
- PLACZEK, W. J., WEI, J., KITADA, S., ZHAI, D., REED, J. C. & PELLECCIA, M. 2010. A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. *Cell Death & Disease*, 1, e40-e40.
- POOLEY, J. L., HEATH, W. R. & SHORTMAN, K. 2001. Cutting Edge: Intravenous Soluble Antigen Is Presented to CD4 T Cells by CD8-Dendritic Cells, but Cross-Presented to CD8 T Cells by CD8+Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 166, 5327-5330.
- PROIETTO, A. I., VAN DOMMELEN, S., ZHOU, P., RIZZITELLI, A., D'AMICO, A., STEPTOE, R. J., NAIK, S. H., LAHOUD, M. H., LIU, Y., ZHENG, P., SHORTMAN, K. & WU, L. 2008. Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 19869-19874.
- PULENDRAN, B., LINGAPPA, J., KENNEDY, M. K., SMITH, J., TEEPE, M., RUDENSKY, A., MALISZEWSKI, C. R. & MARASKOVSKY, E. 1997. Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *The Journal of Immunology*, 159, 2222-31.
- PURÉ, E., INABA, K., CROWLEY, M. T., TARDELLI, L., WITMER-PACK, M. D., RUBERTI, G., FATHMAN, G. & STEINMAN, R. M. 1990. Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. *Journal of Experimental Medicine*, 172, 1459-1469.
- QUINTANA, F. J. & SHERR, D. H. 2013. Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity. *Pharmacological Reviews*, 65, 1148-61.
- QURESHI, S. T., LARIVIÈRE, L., LEVEQUE, G., CLERMONT, S., MOORE, K. J., GROS, P. & MALO, D. 1999. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *Journal of Experimental Medicine*, 189, 615-25.
- RAVINDRAN, R., RUSCH, L., ITANO, A., JENKINS, M. K. & MCSORLEY, S. J. 2007. CCR6-dependent recruitment of blood phagocytes is necessary for rapid CD4 T cell responses to local bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 12075-12080.
- REIS E SOUSA, C., STAHL, P. D. & AUSTYN, J. M. 1993. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *Journal of Experimental Medicine*, 178, 509-19.

- REYA, T., MORRISON, S. J., CLARKE, M. F. & WEISSMAN, I. L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414, 105-111.
- RISSOAN, M. 1999. Reciprocal Control of T Helper Cell and Dendritic Cell Differentiation. *Science*, 283, 1183-1186.
- ROAKE, J. A., RAO, A. S., MORRIS, P. J., LARSEN, C. P., HANKINS, D. F. & AUSTYN, J. M. 1995. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *Journal of Experimental Medicine*, 181, 2237-2247.
- ROBAYS, L. J., MAES, T., LEBECQUE, S., LIRA, S. A., KUZIEL, W. A., BRUSSELLE, G. G., JOOS, G. F. & VERMAELEN, K. V. 2007. Chemokine Receptor CCR2 but Not CCR5 or CCR6 Mediates the Increase in Pulmonary Dendritic Cells during Allergic Airway Inflammation. *The Journal of Immunology*, 178, 5305-5311.
- ROMANI, N., KOIDE, S., CROWLEY, M., WITMER-PACK, M., LIVINGSTONE, A. M., FATHMAN, C. G., INABA, K. & STEINMAN, R. M. 1989. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *Journal of Experimental Medicine*, 169, 1169-1178.
- RONCAROLO, M. G., BACCHETTA, R., BORDIGNON, C., NARULA, S. & LEVINGS, M. K. 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunological Reviews*, 182, 68-79.
- ROSE, C. E., JR., LANNIGAN, J. A., KIM, P., LEE, J. J., FU, S. M. & SUNG, S. S. 2010. Murine lung eosinophil activation and chemokine production in allergic airway inflammation. *Cellular & Molecular Immunology*, 7, 361-74.
- SALLUSTO, F., CELLA, M., DANIELI, C. & LANZAVECCHIA, A. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *Journal of Experimental Medicine*, 182, 389-400.
- SARAIVA, M. & O'GARRA, A. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10, 170-181.
- SAUNDERS, D. 1996. Dendritic Cell Development in Culture from Thymic Precursor Cells in the Absence of Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor. *Journal of Experimental Medicine*, 184, 2185-2196.
- SCANNELL, M., FLANAGAN, M. B., DESTEFANI, A., WYNNE, K. J., CAGNEY, G., GODSON, C. & MADERNA, P. 2007. Annexin-1 and Peptide Derivatives Are Released by Apoptotic Cells and Stimulate Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils by Macrophages. *The Journal of Immunology*, 178, 4595-4605.
- SCHEEREN, R. A., KOOPMAN, G., VAN DER BAAN, S., MEIJER, C. J. L. M. & PALS, S. T. 1991. Adhesion receptors involved in clustering of blood dendritic cells and T lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 21, 1101-1105.
- SCHEINECKER, C., MCHUGH, R., SHEVACH, E. M. & GERMAIN, R. N. 2002. Constitutive Presentation of a Natural Tissue Autoantigen Exclusively by Dendritic Cells in the Draining Lymph Node. *Journal of Experimental Medicine*, 196, 1079-1090.

- SCHNORRER, P., BEHRENS, G. M., WILSON, N. S., POOLEY, J. L., SMITH, C. M., EL-SUKKARI, D., DAVEY, G., KUPRESANIN, F., LI, M., MARASKOVSKY, E., BELZ, G. T., CARBONE, F. R., SHORTMAN, K., HEATH, W. R. & VILLADANGOS, J. A. 2006. The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 10729-34.
- SCHRAML, B. U. & REIS E SOUSA, C. 2015. Defining dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*, 32, 13-20.
- SCHREINER, J., KRETSCHMER, D., KLENK, J., OTTO, M., BUHRING, H. J., STEVANOVIC, S., WANG, J. M., BEER-HAMMER, S., PESCHEL, A. & AUTENRIETH, S. E. 2013. Staphylococcus aureus phenol-soluble modulin peptides modulate dendritic cell functions and increase in vitro priming of regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 190, 3417-26.
- SCHULER, G., ROMANI, N. & STEINMAN, R. M. 1985. A comparison of murine epidermal Langerhans cells with spleen dendritic cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 85, 99s-106s.
- SCHULER, G. & STEINMAN, R. M. 1985. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *Journal of Experimental Medicine*, 161, 526-546.
- SCHULZ, O., JAENSSON, E., PERSSON, E. K., LIU, X., WORBS, T., AGACE, W. W. & PABST, O. 2009. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *Journal of Experimental Medicine*, 206, 3101-3114.
- SEGURA, E. & AMIGORENA, S. 2013. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends in Immunology*, 34, 440-445.
- SEGURA, E., TOUZOT, M., BOHINEUST, A., CAPPUCCIO, A., CHIOCCHIA, G., HOSMALIN, A., DALOD, M., SOUMELIS, V. & AMIGORENA, S. 2013. Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity*, 38, 336-348.
- SERBINA, N. V. & PAMER, E. G. 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature Immunology*, 7, 311-317.
- SERBINA, N. V., SALAZAR-MATHER, T. P., BIRON, C. A., KUZIEL, W. A. & PAMER, E. G. 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*, 19, 59-70.
- SHORTMAN, K. & HEATH, W. R. 2010. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunological Reviews*, 234, 18-31.
- SICHEN, D., SCOTT, C. L., MARTENS, L., VANDERKERKEN, M., VAN GASSEN, S., PLANTINGA, M., JOERIS, T., DE PRIJCK, S., VANHOUTTE, L., VANHEERSWYNGHEL, M., VAN ISTERDAEL, G., TOUSSAINT, W., MADEIRA, F. B., VERGOTE, K., AGACE, W. W., CLAUSEN, B. E., HAMMAD, H., DALOD, M., SAEYS, Y., LAMBRECHT, B. N. & GUILLIAMS, M. 2016. IRF8 Transcription Factor Controls Survival and Function of Terminally Differentiated Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells, Respectively. *Immunity*, 45, 626-640.
- SIDDIQUI, K. R., LAFFONT, S. & POWRIE, F. 2010. E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis. *Immunity*, 32, 557-67.

- SKOKOS, D., SHAKHAR, G., VARMA, R., WAITE, J. C., CAMERON, T. O., LINDQUIST, R. L., SCHWICKERT, T., NUSSENZWEIG, M. C. & DUSTIN, M. L. 2007. Peptide-MHC potency governs dynamic interactions between T cells and dendritic cells in lymph nodes. *Nature Immunology*, 8, 835-844.
- SOLITO, E., KAMAL, A., RUSSO-MARIE, F., BUCKINGHAM, J. C., MARULLO, S. & PERRETTI, M. 2003. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *The FASEB Journal*, 17, 1544-6.
- SPANGRUDE, G., HEIMFELD, S. & WEISSMAN, I. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, 241, 58-62.
- SPENCER, S. L., GAUDET, S., ALBECK, J. G., BURKE, J. M. & SORGER, P. K. 2009. Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature*, 459, 428-432.
- STEINBRINK, K., WÖFL, M., JONULEIT, H., KNOP, J. & ENK, A. H. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 159, 4772-80.
- STEINMAN, R. M. 1991. The Dendritic Cell System and its Role in Immunogenicity. *Annual Review of Immunology*, 9, 271-296.
- STEINMAN, R. M. & COHN, Z. A. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of Experimental Medicine*, 137, 1142-62.
- STEINMAN, R. M. & COHN, Z. A. 1974. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *Journal of Experimental Medicine*, 139, 380-97.
- STEINMAN, R. M., HAWIGER, D. & NUSSENZWEIG, M. C. 2003. TOLEROGENIC DENDRITIC CELLS. *Annual Review of Immunology*, 21, 685-711.
- STEINMAN, R. M., KAPLAN, G., WITMER, M. D. & COHN, Z. A. 1979. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *Journal of Experimental Medicine*, 149, 1-16.
- STRANGES, P. B., WATSON, J., COOPER, C. J., CHOISY-ROSSI, C.-M., AUSTIN, BEIGHTON, R. A., HARTIG, H., SUNDBERG, J. P., SERVICK, S., KAUFMANN, G., FINK, P. J. & CHERVONSKY, A. V. 2007. Elimination of Antigen-Presenting Cells and Autoreactive T Cells by Fas Contributes to Prevention of Autoimmunity. *Immunity*, 26, 629-641.
- SU, S. B., GONG, W., GAO, J.-L., SHEN, W., MURPHY, P. M., OPPENHEIM, J. J. & WANG, J. M. 1999. A Seven-transmembrane, G Protein-coupled Receptor, FPRL1, Mediates the Chemotactic Activity of Serum Amyloid A for Human Phagocytic Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 189, 395-402.
- SUNG, S.-S. J., FU, S. M., ROSE, C. E., GASKIN, F., JU, S.-T. & BEATY, S. R. 2006. A Major Lung CD103 (αE)-β7 Integrin-Positive Epithelial Dendritic Cell Population Expressing Langerin and Tight Junction Proteins. *The Journal of Immunology*, 176, 2161-2172.
- SUZUKI, S., HONMA, K., MATSUYAMA, T., SUZUKI, K., TORIYAMA, K., AKITOYO, I., YAMAMOTO, K., SUEMATSU, T., NAKAMURA, M., YUI, K. & KUMATORI, A. 2004. Critical roles of interferon regulatory factor 4 in

- CD11b<sup>high</sup>CD8 $\alpha$ -dendritic cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 8981-8986.
- TACKE, F., GINHOUX, F., JAKUBZICK, C., VAN ROOIJEN, N., MERAD, M. & RANDOLPH, G. J. 2006. Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *Journal of Experimental Medicine*, 203, 583-597.
- TAKANO, T., FIORE, S., MADDOX, J. F., BRADY, H. R., PETASIS, N. A. & SERHAN, C. N. 1997. Aspirin-triggered 15-Epi-Lipoxin A4 (LXA4) and LXA4 Stable Analogues Are Potent Inhibitors of Acute Inflammation: Evidence for Anti-inflammatory Receptors. *Journal of Experimental Medicine*, 185, 1693-1704.
- TANG, A., AMAGAI, M., GRANGER, L. G., STANLEY, J. R. & UDDY, M. C. 1993. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature*, 361, 82-85.
- THOMPSON, D., MCARTHUR, S., HISLOP, J. N., FLOWER, R. J. & PERRETTI, M. 2014. Identification of a novel recycling sequence in the C-tail of FPR2/ALX receptor: association with cell protection from apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 36166-78.
- TOMURA, M., HATA, A., MATSUOKA, S., SHAND, F. H. W., NAKANISHI, Y., IKEBUCHI, R., UEHA, S., TSUTSUI, H., INABA, K., MATSUSHIMA, K., MIYAWAKI, A., KABASHIMA, K., WATANABE, T. & KANAGAWA, O. 2015. Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Scientific Reports*, 4.
- TOYAMA-SORIMACHI, N., OMATSU, Y., ONODA, A., TSUJIMURA, Y., IYODA, T., KIKUCHI-MAKI, A., SORIMACHI, H., DOHI, T., TAKI, S., INABA, K. & KARASUYAMA, H. 2005. Inhibitory NK Receptor Ly49Q Is Expressed on Subsets of Dendritic Cells in a Cellular Maturation- and Cytokine Stimulation-Dependent Manner. *The Journal of Immunology*, 174, 4621-4629.
- TRAVER, D., AKASHI, K., MANZ, M., MERAD, M., MIYAMOTO, T., ENGLEMAN, E. G. & WEISSMAN, I. L. 2000. Development of CD8<sup>+</sup>-Positive Dendritic Cells from a Common Myeloid Progenitor. *Science*, 290, 2152-2154.
- TSUJIMOTO, Y., GORHAM, J., COSSMAN, J., JAFFE, E. & CROCE, C. M. 1985. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*, 229, 1390-3.
- UEMATSU, S., JANG, M. H., CHEVRIER, N., GUO, Z., KUMAGAI, Y., YAMAMOTO, M., KATO, H., SOUGAWA, N., MATSUI, H., KUWATA, H., HEMMI, H., COBAN, C., KAWAI, T., ISHII, K. J., TAKEUCHI, O., MIYASAKA, M., TAKEDA, K. & AKIRA, S. 2006. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c<sup>+</sup> lamina propria cells. *Nature Immunology*, 7, 868-874.
- VAN STIJN, A., KOK, A., VAN DER POL, M. A., FELLER, N., ROEMEN, G. M. J. M., WESTRA, A. H., OSSENKOPPELE, G. J. & SCHUURHUIS, G. J. 2003. A flow cytometric method to detect apoptosis-related protein expression in minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 17, 780-786.
- VAROL, C., LANDSMAN, L., FOGG, D. K., GREENSHTEIN, L., GILDOR, B., MARGALIT, R., KALCHENKO, V., GEISSMANN, F. & JUNG, S. 2007.

- Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 204, 171-80.
- VAUGHN, M. W., PROSKE, R. J. & HAVILAND, D. L. 2002. Identification, Cloning, and Functional Characterization of a Murine Lipoxin A4 Receptor Homologue Gene. *The Journal of Immunology*, 169, 3363-3369.
- VAUX, D. L., CORY, S. & ADAMS, J. M. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335, 440-442.
- VAUX, D. L., HAECKER, G. & STRASSER, A. 1994. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*, 76, 777-9.
- VOEDISCH, S., KOENECKE, C., DAVID, S., HERBRAND, H., FÖRSTER, R., RHEN, M. & PABST, O. 2009. Mesenteric lymph nodes confine dendritic cell-mediated dissemination of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and limit systemic disease in mice. *Infect Immun*, 77, 3170-80.
- VREMEC, D., POOLEY, J., HOCHREIN, H., WU, L. & SHORTMAN, K. 2000. CD4 and CD8 Expression by Dendritic Cell Subtypes in Mouse Thymus and Spleen. *The Journal of Immunology*, 164, 2978-2986.
- VREMEC, D. & SHORTMAN, K. 1997. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *The Journal of Immunology*, 159, 565-73.
- VREMEC, D., ZORBAS, M., SCOLLAY, R., SAUNDERS, D. J., ARDAVIN, C. F., WU, L. & SHORTMAN, K. 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 176, 47-58.
- WANG, J., ZHENG, L., LOBITO, A., CHAN, F. K.-M., DALE, J., SNELLER, M., YAO, X., PUCK, J. M., STRAUS, S. E. & LENARDO, M. J. 1999. Inherited Human Caspase 10 Mutations Underlie Defective Lymphocyte and Dendritic Cell Apoptosis in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Type II. *Cell*, 98, 47-58.
- WASKOW, C., LIU, K., DARRASSE-JÈZE, G., GUERMONPREZ, P., GINHOUX, F., MERAD, M., SHENGELIA, T., YAO, K. & NUSSENZWEIG, M. 2008. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nature Immunology*, 9, 676-683.
- WEBER, M., HAUSCHILD, R., SCHWARZ, J., MOUSSON, C., DE VRIES, I., LEGLER, D. F., LUTHER, S. A., BOLLENBACH, T. & SIXT, M. 2013. Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients. *Science*, 339, 328-32.
- WILSON, N. S., BEHRENS, G. M. N., LUNDIE, R. J., SMITH, C. M., WAITHMAN, J., YOUNG, L., FOREHAN, S. P., MOUNT, A., STEPTOE, R. J., SHORTMAN, K. D., DE KONING-WARD, T. F., BELZ, G. T., CARBONE, F. R., CRABB, B. S., HEATH, W. R. & VILLADANGOS, J. A. 2006. Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nature Immunology*, 7, 165-172.
- WILSON, N. S., EL-SUKKARI, D., BELZ, G. T., SMITH, C. M., STEPTOE, R. J., HEATH, W. R., SHORTMAN, K. & VILLADANGOS, J. A. 2003. Most

- lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood*, 102, 2187-2194.
- WILSON, N. S. & VILLADANGOS, J. A. 2005. Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Advances in Immunology*, 86, 241-305.
- WINKEL, K., SOTZIK, F., VREMEC, D., CAMERON, P. U. & SHORTMAN, K. 1994. CD4 and CD8 expression by human and mouse thymic dendritic cells. 40, 93-99.
- WORBS, T., HAMMERSCHMIDT, S. I. & FÖRSTER, R. 2017. Dendritic cell migration in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 17, 30-48.
- XU, Y., ZHAN, Y., LEW, A. M., NAIK, S. H. & KERSHAW, M. H. 2007. Differential Development of Murine Dendritic Cells by GM-CSF versus Flt3 Ligand Has Implications for Inflammation and Trafficking. *The Journal of Immunology*, 179, 7577-7584.
- YAMAZAKI, S., DUDZIAK, D., HEIDKAMP, G. F., FIORESE, C., BONITO, A. J., INABA, K., NUSSENZWEIG, M. C. & STEINMAN, R. M. 2008. CD8+CD205+ Splenic Dendritic Cells Are Specialized to Induce Foxp3+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 181, 6923-6933.
- YANG, D., CHEN, Q., LE, Y., WANG, J. M. & OPPENHEIM, J. J. 2001. Differential Regulation of Formyl Peptide Receptor-Like 1 Expression During the Differentiation of Monocytes to Dendritic Cells and Macrophages. *The Journal of Immunology*, 166, 4092-4098.
- YE, R. D., BOULAY, F., WANG, J. M., DAHLGREN, C., GERARD, C., PARMENTIER, M., SERHAN, C. N. & MURPHY, P. M. 2009. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the Formyl Peptide Receptor (FPR) Family. *Pharmacological Reviews*, 61, 119-161.
- YOUNG, L. J., WILSON, N. S., SCHNORRER, P., MOUNT, A., LUNDIE, R. J., LA GRUTA, N. L., CRABB, B. S., BELZ, G. T., HEATH, W. R. & VILLADANGOS, J. A. 2007. Dendritic cell preactivation impairs MHC class II presentation of vaccines and endogenous viral antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 17753-8.
- ZELANTE, T., IANNITTI, R. G., CUNHA, C., DE LUCA, A., GIOVANNINI, G., PIERACCINI, G., ZECCHI, R., D'ANGELO, C., MASSI-BENEDETTI, C., FALLARINO, F., CARVALHO, A., PUC CETTI, P. & ROMANI, L. 2013. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*, 39, 372-85.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der medizinischen Klinik für Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Stella E. Autenrieth durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. rer. nat. Stella E. Autenrieth.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Prof. Dr. rer. nat. Stella Autenrieth, Manina Günter, Juliane Klenk und Kristin Bieber von mir mit Unterstützung durch Manina Günter, Juliane Klenk und Alessia Voss durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte, nach Anleitung durch Prof. Dr. rer. nat. Stella Autenrieth, durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Prof. Dr. rer. nat. Stella Autenrieth verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 14.02.2022

Handwritten signature of Ulf Hayne in black ink.



## 8 Danksagung

In besonderem Maße möchte ich meiner Betreuerin Prof. Dr. Stella Autenrieth für die gute Betreuung und große Geduld danken. Weiterhin danke ich der gesamten AG Autenrieth und der FCF Berg. Hier möchte ich mich besonders bei Manina Günter und Juliane Klenk für die sorgfältige und geduldige Einarbeitung bedanken, ohne die meine Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Der medizinischen Fakultät danke ich für die Möglichkeit als Stipendiat am IZKF Promotionskollegs teilnehmen zu können und für die finanzielle und fachliche Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meiner Familie, Lara, Bettina, Ralf und Ursula Heyne, für ihre Unterstützung bedanken sowie bei Sandra Dürr für ihren emotionalen Beistand. Ohne euch hätte ich es nicht geschafft.