Universität Ulm
Medizinische Fakultät
Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor:
Prof. Dr. Seufferlein

Fraktalkinrezeptor (CX_3CR1) positive Makrophagen fördern eine IL-22 Produktion während einer *C. rodentium* Infektion

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von: **Calin-Petru Manta**
Geboren in Bukarest, Rumänien

2012

Dekan : Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter : PD. Dr. med. Jan-Hendrik Niess

2. Berichterstatter : Prof. Dr. biol. hum. Uwe Knippschild

Tag der Promotion : 18.02.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abkürzungsverzeichnis III

1. Einleitung ..... - 1 -

1.1 Einführung in das Immunsystem ..... - 1 -
1.2 Das angeborene Immunsystem im Darm ..... - 2 -
1.3 Das adaptive Immunsystem ..... - 4 -
1.4 Die Anatomie des Immunsystems ..... - 7 -
1.5 Interaktion des Immunsystems mit der Darmflora ..... - 9 -
1.6 Fraktalkin und der Fraktalkinrezeptor ..... - 12 -
1.7 Aufteilung der antigenpräsentierenden Zellen im Intestinum ..... - 15 -
1.8 Die Entwicklung der Innate lymphoid cells ..... - 17 -
1.9 Die Rolle von IL-22 im Intestinum ..... - 20 -
1.10 *Citrobacter rodentium* als Infektionsmodell ..... - 22 -
1.11 Ziele des Projekts ..... - 26 -

2. Materialien und Methoden ..... - 27 -

2.1 Mauslinien ..... - 27 -
2.2 Behandlung der CD11c DOG Mäuse mit Diphterietoxin ..... - 28 -
2.3 *Citrobacter rodentium* Stamm ..... - 28 -
2.4 Die Generierung des rot fluoreszierenden *C. rodentium* (RF-*C. rodentium*) ..... - 29 -
2.5 *Citrobacter rodentium* Infektion ..... - 31 -
2.6 Bestimmung von *Citrobacter rodentium* in Leber, Milz, den mesenterischen Lymphknoten und im Stuhl ..... - 32 -
2.7 Konfokale Mikroskopie ..... - 33 -
2.8 Detektion der anti-*C. rodentium* Serum Titer ..... - 33 -
2.9 Agarose Gel ..... - 34 -
2.10 Detektion mittels quantitativer „Realtime“ (RT) -PCR ..... - 35 -
2.11 Isolation von Blutzellen ..... - 38 -
2.12 Fluoreszenzmikroskopie und Agglutinin Färbung ..... - 38 -
2.13 Zellanreicherung von CD11c Makrophagen durch MACS ..... - 39 -
2.14 Isolation von Lymphozyten aus der Kolon Lamina Propria ..... - 41 -
2.15 Durchflusszytometrische Analyse ..... - 42 -
2.16 Statitische Analyse der Ergebnisse ..... - 45 -

3. Ergebnisse ..... - 46 -

3.1 Die Abwesenheit des CX_3CR1 ist mit einer verspäteten Beseitigung von *Citrobacter rodentium* verbunden ..... - 46 -
3.2 CX_3CR1^+ $CD11c^+$ Makrophagen und Fraktalkin werden nach der Infektion mit *C. rodentium* hochreguliert ..... - 49 -
3.3 CX_3CR1^+ Makrophagen ko-lokalisieren mit *C. rodentium* ..... - 55 -
3.4 Interleukin-22 ist in CX_3CR1-GFP Mäusen vermindert ..... - 58 -
3.5 CX_3CR1-GFP x $RAG^{-/-}$ zeigen erhöhte Mortalität nach der Infektion mit *C. rodentium* ..... - 65 -
3.6 $CD11c^+CX_3CR1^+$ Zellen sind notwendig für die Beseitigung von *C. rodentium* ..... - 69 -

4. Diskussion ..... - 76 -

4.1 *C. rodentium* führt zur Akkumulation der CX_3CR1 Makrophagen ..... - 76 -
4.2 CX_3CR1 Makrophagen phagozytieren *C. rodentium* ..... - 78 -
4.3 Innate lymphoid cells 22 werden durch CX_3CR1 Makrophagen induziert ..... - 79 -
4.4 Innate lymphoid cells 22 induzieren die Expression antimikrobieller Peptiden ..... - 81 -

4.5 Schlussfolgerung ..... - 82 -

5. Zusammenfassung ..... - 84 -

6. Literaturverzeichnis ..... - 86 -

7. Anhang ..... - 98 -

Danksagung ..... - 98 -
Curriculum Vitae ..... - 100 -
Publikationen ..... - 101 -
Auszeichnungen ..... - 101 -

Abkürzungsverzeichnis

A/E - Attaching/ effacing Läsion
Akt - Proteinkinase B
APC - Allophycocyanin
APZ - Antigen-präsentierende Zellen
B Zellen - Bone marrow Zellen
BALT - Bronchial associated lymphoid tissue
BSA - Bovine serum albumin
BZR - B Zellrezeptor
C - Carboxy- Terminus
CD - Cluster of differentiation
cDNS - Copy Desoxyribonukeinsäure
CED - Chronische entzündliche Darmerkrankung
CFU - Kolonieformende Einheiten
CLP - Colonic patches
CmLP - Common Lymphoid Progenitor
CX3CL1 - Fraktalkinligand
CX3CR1 - Fraktalkinrezeptor
DNS - Desoxyribonukeinsäure
DSS - Dextran sodium sulphat
DT - Diphtherietoxin
DZ - Dendritische Zellen
EDTA - Ethylendiamintetraacetat
EHEC - Enterohämorrhagischer *Escherichia coli*
ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay
EPEC - Enteropathogener *Escherichia coli*
FCS - Fetal calf serum
FITC - Fluoresceinisothiocyanat
FKN - Fraktalkin
Flt - FMS-like tyrosine kinase
GALT - Gut associated lymphoid tissue
GDP - Guanosindiphosphat
GFP - Green Fluorescent Protein

GM-CSF - Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor
GTP - Guanosintriphosphat
HUS - Hämolytisches urämischen Syndrom
Id - Inhibitor of DNA
Ig - Immunglobuline
IL - Interleukin
ILC - Innate lymphoid cells
ILF - Isolated lymphoid follicles
INF - Interferon
IP - Intraperitoneal
ITAM - Immunoreceptor tyrosine activation motive
Jak - Januskinase
kDZ - Konventionelle DZ
KLP - Kolon Lamina Propria
kNK - Konventionelle Natürliche Killer Zellen
LB - Luria-Bertani
LEE - Locus for enterozyte effacement
LK - Lymphknoten
LTi - Lymphoid tissue-inducer cells
MACS - Magnetic Cell Sorting
mAK - Monoklonaler Antikörper
MC - Morbus Crohn
MHC - Major histcompatibility complex
MLN - Mesenterische Lymphknoten
MP - Makrophagen
MPEC - Murine enterophatogenic *Escherichia coli*
Muc - Mucine
M-Zellen - Microfold Zellen
N - Amino- Terminus
NALT - Nasal associated lymphoid tissue
NIK - Nuclear factor-kappa-B inducing kinase
NK - Natürliche Killer Zellen
NKT - Natürliche Killer Thymus Zellen
NKκB - Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NO - Stickstoffoxid
OD - Optische Dichte
PAMP - Pathogen associated molecular patterns
PBS - Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR - Polymerase Kettenreaktion
pDZ - Plasmazytoide DZ
PE - Phycoerythrin
PFA - Paraformaldehyd
PI - Pathogenicity islands
PI3K - Phosphoinositid 3-Kinase -
PKD - Proteinkinase D
PMA - Phorbol 12-myristate 13-acetate
PNPP - 4- Nitrophenylphosphat Disodium Hexahydrat
PP - Peyer`s Paches
PRR - Pattern recognition receptor
qRT-PCR - Quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion
R - Rezeptor
Rag - Rekombinase
Reg - Regenerating islet-dirived protein
RNS - Ribonukleinsäure
ROR - RAR-related orphan receptor
RPMI - Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR - Realtime Polymerase Kettenreaktion
SDS - Sodiumdodecylsulfat
SPF - Spezifisch Pathogen frei
Stat - Signal Transducers and Acvtivators of Transcription
T Zellen - Thymus Zellen
TACE - Tumor-necrosis factor α (TNFα) converting enzyme
TNF - Tumor-necrosis factor
TpI - Tage post Infektion
T_{reg} - Regulatorische T Zellen
Tyk - Tyrosinkinase
TZR - T Zellrezeptor

1. Einführung

1.1 Einführung in das Immunsystem

Das Wort Immunsystem stammt vom lateinischen Begriff immunitas [2, 49]. Immunitas bezog sich auf den Schutz der römischen Senatoren während der Ausführung ihres Amtes [2]. Demzufolge bedeutet “Immunsystem“ den Schutz vor Krankheiten durch Mikroben, die den Organismus angreifen [2].

Dies stellt im Darm eine besondere Herausforderung dar. Die Darmflora, die für das Überleben notwendig ist, setzt sich aus nicht-pathogenen Bakterien zusammen. Obwohl diese Bakterien keine Krankheitserreger darstellen, muss das Immunsystem im Darm eine Barriere gegen diese errichten, da die Überflutung mit Antigenen sonst zur Erkrankung bzw. zu einer Entzündung führen würde. Dies ist z.B. bei chronisch entzündlicher Darmerkrankung (CED) der Fall. Bei dieser Erkrankung können verschiedene Faktoren nicht mehr durch die Darmflora in Schach gehalten werden und führen zu einer permanenten Entzündung.

Das Darmimmunsystem muss also Mechanismen entwickeln, um die Bakterien der Darmflora von pathogenen Bakterien unterscheiden zu können. So tragen dendritische Zellen (DZ) und Makrophagen (MP) dazu bei, die Darmflora in Schach zu halten und dem Immunsystem Antigene zu präsentieren. Dringt ein Pathogen in dieses System ein, muss das Immunsystem diesen Eindringling effektiv bekämpfen.

C. rodentium ist ein solcher Erreger. Er verfügt über die nötigen Mechanismen, um den Darm besiedeln und beschädigen zu können. Dabei verfügt dieses Pathogen über ähnliche Virulenzfaktoren, wie Enteropathogene *Escherichia coli* (*EPEC*). Mit seinen Virulenzfaktoren beschädigt *EPEC* das Darmgewebe und verursacht dadurch eine Entzündung.

Eine wichtige Rolle bei der Abwehr solcher Pathogene spielt das angeborene und das adaptive Immunsystem. Während das angeborene Immunsystem immer einsatzbereit ist, kommt das adaptive Immunsystem erst nach der Infektion zum Einsatz. Hierbei spielen Thymus (T) Zellen eine wichtige Rolle. Sie vermitteln durch die Expression von Zytokinen die Aktivierung von “bone marrow“ (B) Zellen, welche wiederum essentiell für die Beseitigung des Erregers sind. Das

angeborene Immunsystem ist während der ersten Phase der Infektion entscheidend. So kann es mittels DZ und MP den Erreger in Schach halten. DZ und MP vermitteln durch I) Phagozytose, II) durch Aktivierung von Effektorzellen mittels Zytokine und III) durch Aktivierung des adaptiven Immunsystems die Bekämpfung der Erreger.

1.2 Das angeborene Immunsystem im Darm

Das angeborene Immunsystem ist evolutiv betrachtet der älteste Anteil des Immunsystems [2, 53]. Es ist zudem die erste Barriere in der Abwehrkette des Immunsystems. Es verhindert somit, dass Mikroben sich im gesamten Organismus unkontrolliert ausbreiten können [2, 53]. Zum angeborenen Immunsystem gehören I) epitheliale Barrieren, wie die Haut und das Epithelgewebe der Darmschleimhaut, II) Phagozyten, III) Natürliche Killer (NK) Zellen und IV) das Komplementsystem [53]. Beim Angriff eines Pathogens auf den Organismus ist das angeborene Immunsystem sofort im Stande, eine Immunantwort herbeizuführen [2, 53]. Die Erkennung der Angreifer wird durch so genannte “pattern recognition receptor“ (PRR) (Abb.1) vermittelt [2]. PRRs sind Rezeptoren, welche im Stande sind, Muster von Pathogenen zu erkennen [2, 53]. Diese Muster befinden sich nicht auf körpereigenen Zellen, sondern werden nur von Mikroben exprimiert [2]. Das angeborene Immunsystem ist aber nur in der Lage, eine beschränkte Anzahl solcher Muster zuerkennen, während das adaptive Immunsystem ein breites Spektrum an teils unbekannten Antigenen erkennen kann [2, 53].

Substanzen, die das angeborene Immunsystem stimulieren, werden “pathogen associated molecular patterns“ (PAMP) genannt, diese binden an PRR [2, 53, 86]. Zu den PAMP kann man doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNS) (wie in Viren), oder unmethylierte CpG (hoher Anteil an repetitiven Cytosin und Guanin) Desoxyribonukleinsäure (DNS) (wie in Bakterien) zählen, sowie bestimmte Proteine, Lipide oder Zuckerverbindungen die nur auf Oberflächen von Mikroben exprimiert werden [2]. Weitere bekannte PAMP sind Lipopolysaccharide von gram-negativen Bakterien, Teichonsäure von gram-positiven Bakterien und stark mannosehaltige- Oligosaccharide [2, 53]. Die Eigenschaft der PRR, die PAMPs zu

erfassen, ermöglichen es dem angeborenen Immunsystem, fremde Antigene zu erkennen. Allerdings ist es ihm nicht möglich, eigene Moleküle zu identifizieren [2, 53, 86, 100].

Das adaptive Immunsystem hingegen kann *eigene* und *fremde* Moleküle unterscheiden [2]. Somit ist das angeborene Immunsystem im Vergleich zum adaptiven Immunsystem ein relativ einfach aufgebautes System [2, 53]. Trotz der relativ starren Erkennungsmöglichkeiten des angeborenen Immunsystems ist es sehr effizient. In vielen Fällen beseitigt es selbständig die Mikroben und verhindert deren Ausbreitung. Des Weiteren gibt es dem adaptiven Immunsystem Zeit, sich dem Eindringling anzupassen, um diesen abwehren zu können [2, 53, 86].

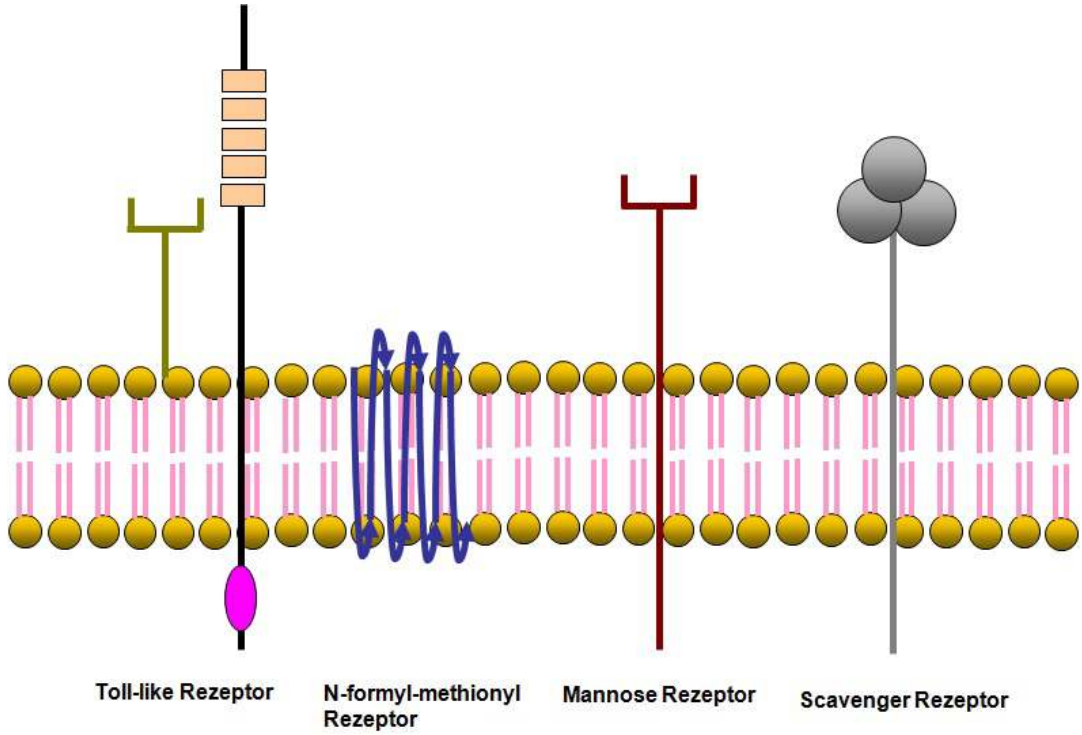


Abbildung 1. Pattern recognition receptors (PRR) des angeborenen Immunsystems.
Die PRR werden aufgeteilt in Toll-like Rezeptor, N-formyl-methionyl Rezeptor, Mannose Rezeptor und Scavanger Rezeptor. (Graphik verändert aus Cellular and Molecular Imunology) [2]

Das angeborene Immunsystem im Darm setzt sich aus mehreren Zelluntereinheiten zusammen. Diese können MP, DZ oder Natürliche Killer (NK) Zellen sein [101, 104]. Sie stellen zusätzlich zu den Epithelzellen eine Barriere und somit einen Abwehrmechanismus dar. Diese Zellen lassen sich mittels Markerprofile unterteilen. Konventionelle DZ (kDZ) lassen sich durch die Expression der Marker oder auch “cluster of differentiation“ (CD), wie CD11c,

CD11b und entweder CD8 oder CD4 charakterisieren [98]. DZ, die in der Kolon Lamina Propria (KLP) enthalten sind, exprimieren CD11c sind aber negativ für CD8 und CD4. Diese DZ werden in I) $CD103^+$, in II) CX_3CR1^+, in III) $CD103^-/CX_3CR1^-$ oder in IV) E-Cadherine positive Untereinheiten eingeteilt [100, 104, 137]. Die MP, die in der KLP vorhanden sind, exprimieren CD11c, CX_3CR1 und F4/80. F4/80 ist ein Marker für maturierte MP [104]. NK Zellen exprimieren den DX5 (CD49b) und den NK1.1 Marker [104]. Die beschriebenen Zellen sind bei der Eindämmung und Bekämpfung von Pathogenen im Organismus beteiligt. Gleichzeitig tragen sie aber auch dazu bei, dass das angeborene Immunsystem eine Toleranz gegenüber der Darmflora entwickelt.

1.3 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem ist erst nach dem angeborenen Immunsystem entstanden [2, 11]. Es wurde erst später von Vertebraten entwickelt [11]. Zellen des adaptiven Immunsystems zirkulieren ständig im Blut und in den Lymphknoten [2]. Zu den Zellen des adaptive Immunsystems zählt man B und T Zellen [2, 11, 51]. Diese Zellen produzieren Interleukine (IL), Chemokine und Immunglobuline (Ig), die zur Bekämpfung und zur Eindämmung der Mikroben führen, wenn das entsprechende Antigen von dem entsprechenden Rezeptor auf den B und T Zellen erkannt wird [2, 51]. Das Zusammenspiel des angeborenen und adaptiven Immunsystems ist hierfür unverzichtbar [2, 51]. Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind im Stande, beim Eindringen einer Mikrobe, diese zu phagozytieren und später den Lymphozyten zu präsentieren [2, 93]. DZ, die dem angeborenen Immunsystem angehören, übernehmen diese Aufgabe. Die DZ lysiert den Erreger und präsentiert dessen Peptide anschließend auf den “major histocompatibility complexes“ (MHC) I und MHC II [2, 51, 93].

Das MHC I wird grundsätzlich von jeder Körperzelle auf dessen Oberfläche exprimiert [2]. Der MHC Rezeptor besteht aus zwei Polypeptidketten, einer α-Kette, welche in drei Abschnitte unterteilt wird und einer β-Mikroglobulin-Kette [2]. Die ersten zwei Abschnitte der α-Kette, α1 und α2 bilden die Tasche, in der das zu präsentierende Peptid eingesetzt wird [2]. Der dritte Abschnitt α3, durchspannt die Membran [2]. Die zweite Kette das β- Mikroglobulin wird nicht kovalent angesetzt.

Der MHC I ist dabei in der Lage Peptide zu präsentieren, die während des Zellstoffwechsels entstehen [2, 93]. Das MHC II hingegen wird nur von spezialisierten Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) exprimiert. Auf diesem Rezeptor werden grundsätzlich Peptide präsentiert, welche aus der Phagozytose von Erregern entstehen [2, 51, 93]. Der Rezeptor besteht aus zwei nicht kovalent gebundenen Ketten, einer α und einer β Kette [2], wobei beide Ketten die Zellmembran durchspannen und gleichzeitig zusammen die Tasche für das zu präsentierende Peptid bilden [2].

DZ sind die einzigen Zellen des Körpers, die sowohl auf MHC I und MHC II gleichzeitig Antigene präsentieren können. Dieser Vorgang wird auch „Crosspräsentation“ genannt [2, 51, 93]. Damit sind DZ als einzige Zellen in der Lage, gleichzeitig naive (T Zellen, die noch niemals Antigen gesehen haben) CD8 T Zellen und CD4 T Zellen, erstmalig zu aktivieren. $CD8^+$ T Zellen sind in der Lage den MHC I zu erkennen, wohingegen $CD4^+$ T Zellen den MHC II erkennen [2, 93]. T Zellen entwickeln sich im Thymus. Deswegen werden sie auch T Zellen genannt [2, 51, 93]. Während der T Zell Entwicklung wird die T Zellrezeptorrekombination durchgeführt. Nach der Rekombination ist die T Zelle in der Lage, nur einen T Zellrezeptor zu exprimieren und dementsprechend auch nur ein Antigen zu erkennen [2, 3]. Die T Zellen sind während dem gesamten Entwicklungsvorgang doppelt positiv für CD4 und CD8 [93]. Erst gegen Ende der Entwicklung entstehen zwei unterschiedliche T Zellpopulationen, die einfach positiv für CD4 oder CD8 sind [2, 93]. T Zellen sind nicht nur in der Lage das präsentierte Peptid auf den MHC Rezeptor mittels des T Zellrezeptors (TZR) zu erkennen, sondern können durch die CD3, CD4 und CD8 Korezeptoren direkt an das MHC binden und dieses dadurch erkennen [2, 3]. Die Erkennung und Bindung von MHC und dem entsprechenden Peptid durch den TZR und den Korezeptoren führen zur Bildung eines Clusters und lösen eine Phosphorylierungskaskade aus [2, 3, 93]. Die Phosphorylierung erfolgt durch intrazelluläre Immunrezeptoren, die über so genannte Tyrosin basierenden Aktivierungsdomänen oder auch “immunoreceptor tyrosine activation motive“ (ITAM) verfügen [2, 3, 53].

Die erstmalige Aktivierung der T Zellen durch DZ geschieht über eine komplexe immunlogische Synapse, bestehend aus der Bindung von MHC mit dem T Zellrezeptor und den Korezeptor CD4 oder CD8. Daraus ergibt sich das erste Signal (Abb. 2) [2]. Wird der MHC und das Peptid von der T Zelle erkannt, kommt

es zum zweiten Signal bestehend aus der Bindung von CD28 (auf der T Zelle) und B 7 (auf DZ), wodurch die T Zelle aktiviert wird [2, 93].

Aktivierte T Zellen sind im Stande, befallene Körperzellen abzutöten. Des Weiteren stellen sie Interleukine her, um Zellen des angeborenen Immunsystems anzulocken und B Zellen zu aktivieren. So werden die T Zellpopulationen in CD4 und CD8 aufgeteilt. CD8 T Zellen erkennen Mikroben, welche in Körperzellen eindringen können. CD4 T Zellen hingegen sind für Mirkoben zuständig, die außerhalb von Körperzellen agieren [2, 93].

Aktivierte CD4 T Zellen, auch T Helfer Zellen genannt, werden in Th1 (IL-12, Interferon (INF) γ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-17) und regulatorische T Zellen (T_{reg}) aufgeteilt. Diese produzieren verschiedenen Interleukine, um eine Inflammation zu aktivieren oder um diese wieder zu deaktivieren. T_{reg} haben dabei die Aufgabe, die Inflammation herunterzufahren [2, 93]. Kommt es zu einer Infektion, werden die T Effektor (Th1, Th2 und Th17) Zellen durch die DZ und MP des angeborene Immunsystems aktiviert.

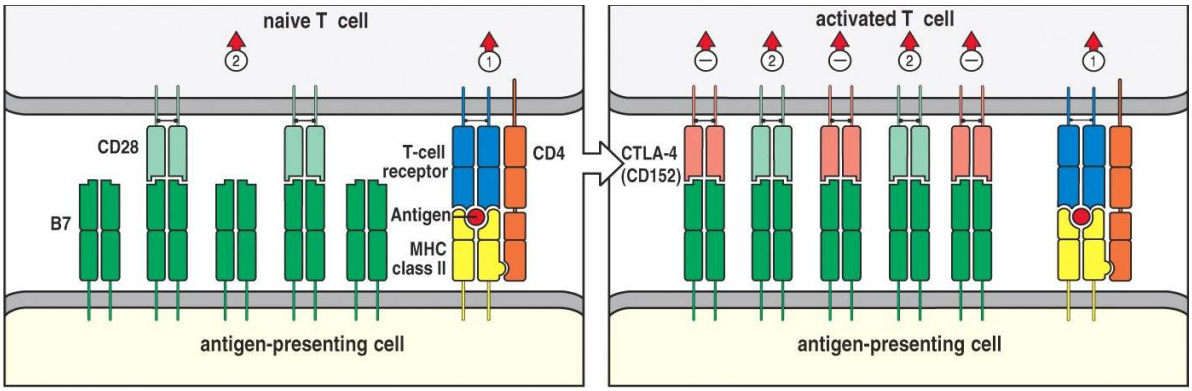


Abbildung 2. Aktivierung von naiven Thymus (T) Zellen durch dendritische Zellen (DZ).
Für die Aktivierung von T Zellen werden zwei Signale benötigt: Signal 1 (TZR+ MHC+Peptid+Korezeptor) und Signal 2 (B7+CD28). [Abkürzungen: CD – "Cluster of differentiation"; B7 - Immunglobulinsuperfamilie B; MHC – "Major histocompatibility complex"; TZR - T Zellrezeptor] Immunobiology 6/e (Garland Scientific 2005)

B Zellen entwickeln sich im Knochenmark (bone marrow, weshalb sie als B Zellen bezeichnet werden). Während der Entwicklung der B Zellen findet die Rekombination des B Zellrezeptors (BZR) statt [2, 93]. Die Rekombination des BZR ist der des TZR sehr ähnlich, außer dass dieser kein MHC erkennen kann, sondern nur das entsprechende Antigen [2, 93]. Der BZR entspricht dem

Antikörper, der von der B Zelle produziert wird [2, 93]. Sekretierte Antikörper haben eine sehr hohe Affinität zu dem Antigen, sie sind in der Lage, diese zu binden und zu neutralisieren [2]. Die sekretierten Antikörper haben unterschiedliche Ketten, wodurch sich ihre Eigenschaft ändern [2, 93]. Ein solcher Vertreter ist das IgM, dieser Antikörper kann Pentamere bilden und wird direkt nach der erstmaligen Aktivierung von B Zellen ausgeschüttet [2, 93]. IgG entstehen nach der zweiten Aktivierung in den B Zellen, nachdem sie einen zweiten Reifungsschritt im Lymphknoten (LK) durchlaufen haben [2, 93]. Die Spezifität und damit die Affinität der IgG sind daher zum jeweiligen Epitop viel höher [93]. IgA sind besonders für die Schleimhäute sehr wichtig, diese werden permanent von B Zellen sekretiert und durchdringen die epitheliale Schicht [46]. So ist dieser Antikörper im Darm besonders wichtig, da das sekretierte IgA die Bakterien der Darmflora in Schach halten kann [46].
Das adaptive Immunsystem im Darm unterliegt, wie das angeborene, einer strengen Regulation. Es trägt zur Eindämmung der Darmflora durch IgA sezernierende B Zellen und zur Toleranz mittels T_{reg} Zellen bei, DZ und MP übernehmen dabei die Antigen Transportrolle.

1.4 Die Anatomie des Immunsystems

Die lymphatischen Organe werden in drei Klassen eingeteilt: Milz, LK und mukosales Lymphgewebe. Im Lymphgewebe befinden sich die naiven B und T Zellen, die durch DZ erst aktiviert werden müssen [2, 145]. Dies geschieht beispielsweise, wenn eine DZ mit einem Pathogen in Kontakt kommt [2, 93]. Die LK sind strikt organisierte Organe. Der LK unterteilt sich in eine B und T Zellzone [2, 93]. Dringt ein Pathogen in den Körper ein, tragen DZ dieses Antigen durch die lymphatischen Gefäße in den LK. Die aktivierten T und B Zellen gehen dann ins Blut [2, 93, 145].
Die Milz hat in Vergleich zu anderen lymphatischen Organen keine direkte Verbindung zum lymphatischen System [93]. Sie sammelt Blutantigene, welche durch Blutübertragung ausgetauscht wurden [93].

Das mukosale Immunsystem teilt sich in: “nasal associated lymphoid tissue“ (NALT), ”bronchial associated lymphoid tissue“ (BALT) und in ”gut associated lymphoid tissue“ (GALT) ein [93].

Zum GALT gehören die Mandeln, die Polypen, der Blinddarm (Appendix) und spezialisierte Strukturen, wie die „Peyer`s Patches“ (PP) [93]. Das GALT beinhaltet ca. 70% aller Immunozyten und stellt zudem das größte sekundäre lymphoide Organ dar [93].

Die PP befinden sich ausschließlich im Dünndarm und sind von der Struktur her den LK sehr ähnlich. Sie unterteilen sich in eine B und eine T Zellzone [93]. Zusätzlich befinden sich auch DZ in den PP und präsentieren Antigen [2, 93]. Die Besonderheit der PP ist die Verbindung zu den “mircofold“ (M) Zellen. M Zellen sind spezialisierte Zellen, die intestinales Antigen sammeln können, um dieses in den PP dem Immunsystem zu präsentieren [2, 93]. Die Antigene gelangen durch eine spezielle Mukusschicht zu den M Zellen. Diese ist im Vergleich zum restlichen Mukus des Darms weniger viskös und dadurch in engeren Kontakt mit der Darmflora [29, 93].

Im Dickdarm gibt es zwei lymphoide Strukturen, die „isolated lymphoid follicles“ (ILF) und die „colonic patches“ (CLP) [26, 27, 68, 75, 107, 118, 152]. Beide Strukturen sind in der Lage eine Immunantwort zu initiieren, wobei ILF sich aus den so genannten „Cryptopatches“ entwickeln, welche erst nach einer Infektion entstehen [96, 107, 118].

Cryptopatches sind im Dünn- und im Dickdarm zu finden und stellen ein Cluster aus „lymphoid tissue-inducer cells“ (LTi) (diese Zellen gehören den „innate lymphoid cells“ (ILC) an) und DZ dar [26, 29, 107]. Die ILF, die sich daraus entwickeln beinhalten B Zellen, DZ und T Zellen [26, 27, 107]. Die CLP sind ausschließlich im Dickdarm zu finden. Ihre zellulären Bestandteile sind ähnlich der von PP [26, 27, 107]. Für die CLP gilt deswegen auch eine strikte Aufteilung in eine B und T Zellzone [26, 27, 68, 96, 107].

Die Lamina Propria im Dünn- und Dickdarm wird von Phagozyten durchzogen, welche CD4 und CD8 negativ sind. [104] Die Zellen werden in drei Klassen eingeteilt: $CD103^+$, CX_3CR1^+ und E-Cadherin positive Phagozyten [99, 104]. Diese Zellen bilden ein Netzwerk und sind auch in der Lage, Antigen aufzunehmen, um eine Immunreaktion zu induzieren [104].

1.5 Interaktion des Immunsystems mit der Darmflora

Der Organismus wird von einer komplexen Gemeinschaft von Mikroorganismen besiedelt, die zur Verdauung benötigt werden [46, 71, 72]. Diese Mikroorganismen werden auch als Mikroflora bezeichnet. Das enge Zusammenleben des intestinalen Gewebes mit der Darmflora stellt eine große Herausforderung dar. Die Bakterien der Darmflora ($\geq 10^{12}/cm^3$ Darminhalt) werden von Körpergewebe mit Hilfe der epithelialen Schicht voneinander getrennt. Diese Schicht nimmt im Dickdarm des Menschen ca. $200m^2$ ein [46, 84].

Wird die Darmflora von Pathogenen heimgesucht, kann dies weitreichende Folgen haben. Diese reichen von Inflammation bis hin zur Sepsis. Das Immunsystem hat hierfür Mechanismen entwickelt, um die eigene Darmflora zu erkennen und diese von Pathogenen unterscheiden zu können [46, 55, 56].

Ein Mechanismus, um die Kontrolle über die Mikroflora zu behalten, ist die Bildung einer Barriere (Abb. 3) [46, 56, 57]. Hierfür wird Mukus gebildet, der den Kontakt zwischen Bakterien und Epithelzellen verringert [56]. Durch den Mukus wird zusätzlich die Penetration der Bakterien zum intestinalen Gewebe beschränkt. Somit wird auch die Exposition der Bakterien zum Immunsystem verringert [46, 56].

Zusätzlich zum Mukus, werden auch sogenannte Defensine in das Darmlumen ausgeschüttet. Defensine haben eine antimikrobielle Wirkung. Diese Peptide können Bakterien abtöten und werden von den Epithelzellen ausgeschüttet. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist “regenerating islet-derived protein“ (Reg) IIIγ [46, 157].

Defensine gehören zum angeboren Immunsystem. Es gibt aber auch einen Mechanismus, der über Antikörper und somit über das adaptive Immunsystem funktioniert. Hierbei spielt die Ausschüttung von IgA eine wichtige Rolle [46, 80]. Das IgA ist in diesem Fall spezifisch gegen Darmbakterien gerichtet. IgA entsteht mit der Hilfe von DZ, die penetrierte Bakterien aufnehmen und diese dann in den PP, den T und B Zellen präsentieren [79]. Diese IgA^+ B Zellen wandern dann zur intestinalen Lamina Propria und sekretieren dort IgA, das sich gegen Darmbakterien richtet, dadurch wird die Translokation der Bakterien verhindert [46]. Das Immunsystem ist aber auch in der Lage, bakterielle Antigene zu sammeln [46, 79]. Das Sammeln der Antigene geschieht dadurch, dass manche

Bakterien der Mikroflora die epitheliale Schicht durchtreten können [46, 60, 61]. In den meisten Fällen werden die Bakterien direkt durch MP abgetötet. Manchmal jedoch werden die Bakterien auch von DZ eingesammelt und dann anschließend lebend in den mesenterischen Lymphknoten (MLN) präsentiert [46]. Dieser Vorgang führt wiederum zur Expression von IgA.

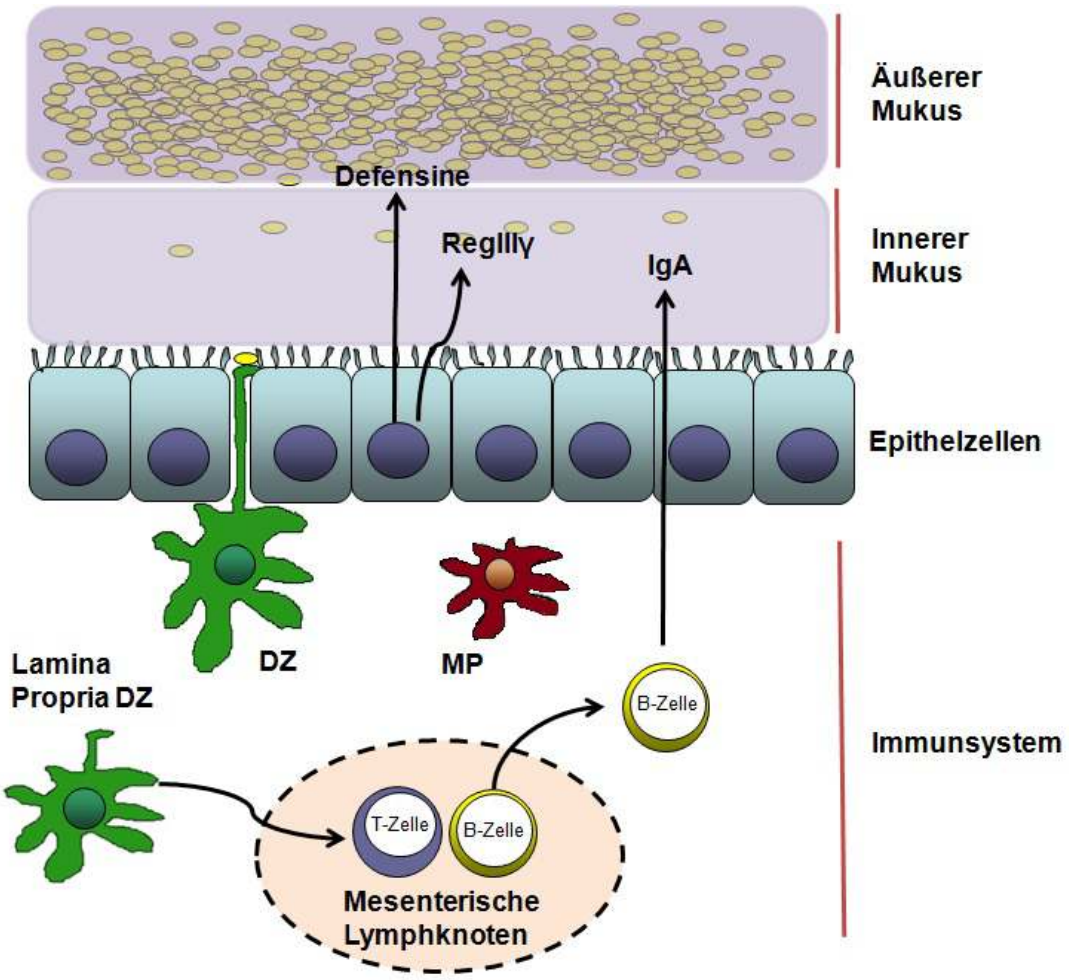


Abbildung 3. Die mukosale Barriere wird durch das angeborene und adaptive Immunsystem unterstützt.

Im äußeren Mukus befindet sich ein hoher Bakterienanteil. Die äußere Mukusschicht wird durch Defensine, welche von den Epithelzellen sekretiert werden, unterstützt. Der innere Mukus wird einerseits durch Defensine und “Regenerating islet-derived protein“ (Reg) IIIγ andererseits auch durch Immunglobulin A (IgA), welches von B Zellen sekretiert wird aufrechtgehalten. Gelingt es Bakterien zu den Epithelzellen durchzudringen, werden diesen von Dendritische Zellen (DZ) und Makrophagen (MP) phagozytiert, wobei MP diese Bakterien lysieren und damit abtöten. DZ transportieren die Bakterien in die mesenterischen Lymphknoten. Die Bakterien werden dort präsentiert. [Abkürzungen: T Zelle - Thymus Zelle; B Zelle – “Bone marrow“ Zelle] (Graphik verändert von Hooper et. al; *Science*) [46]

Es gibt auch andere Zellpopulationen, welche bei der Eindämmung der Mirkoflora helfen. Hierzu gehören die ILC, welche die epitheliale Schicht besiedeln und dem angeboren Immunsystem angehören [144]. ILC haben ähnliche Eigenschaften wie T Helfer Zellen [46]. ILC sind in der Lage das proinflammatorische IL zu bilden, wie z.B. das IL-22 oder IL-17, wobei IL-22 die Expression von antimikrobiellen Peptiden steuert [46, 141].

Die Mikroflora hat auch einen Einfluss auf das Entstehen einer Kolitis. Dies konnte durch Versuche mit keimfreien Mäusen gezeigt werden. Diese Mäuse haben keine Darmflora und konnten deshalb keine Kolitis entwickeln [46, 81].

Die Darmflora spielt nach gängiger Lehrmeinung eine wichtige Rolle in der chronischen Kolitis [114, 135]. Die chronisch entzündliche Darmerkrankung (CED) beschreibt zwei Formen chronischer Kolitis, den Morbus Crohn (MC) und die ulcerative Kolitis [114, 135]. Das Typische für diese Erkrankungen ist, dass bei ihnen ein Gleichgewicht zwischen Ruhezustand und Inflammation entsteht [102, 135].

Es gilt, dass durch genetische-, umwelt- und immunologische- Faktoren die mukosale Schicht nicht aufrechte erhalten werden kann. Dadurch können die Bakterien bis zu den Epithelzellen durchdringen [46, 62, 115, 135].

Durch den Kontakt wird eine T Zell gerichtete Immunantwort herbeigeführt, die zur Inflammtion der Darmschleimhaut führt [46, 135].

Eine Kolitis kann aber auch durch Pathogene hervorgerufen werden. Diese Krankheitserreger besitzen Mechanismen, um sich an die Epithelzellen zu hängen [21, 91]. Die Virulenzfaktoren, welche durch diese Pathogene verwendet werden, führen zur Beschädigung der Darmschleimhaut und anschließend zur Entzündung [89, 91].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Darmflora ein komplexes symbiotisches System aus verschiedenen Bakterien darstellt, welches zur Verdauung der Nährstoffe nötig ist. Die Darmflora ist somit zum Überleben notwendig. Das Immunsystem muss deswegen eine gewisse Toleranz gegenüber den Bakterien der Darmflora entwickeln, um diese nicht zu zerstören. Andererseits muss es Pathogenen erkennen, um diese effizient bekämpfen zu können. Das Zusammenspiel zwischen epithelialer Schicht, den Becherzellen und dem Immunsystem ist daher unerlässlich.

1.6 Fraktalkin und der Fraktalkinrezeptor

Fraktalkin (FKN) ist ein Vertreter der Chemokine. Es ist auch bekannt als Neurotaktin, da dieses Protein Initial im Gehirn entdeckt wurde [49, 82]. Die Aufgaben von Chemokinen ist die Regulation des Immunsystems [49, 82]. Die regulatorischen Aufgaben, die durch Chemokine durchgeführt werden, sind Chemotaxis, Aktivierung von Lymphozyten und die Adhäsion von Lymphozyten [49].

Chemokine werden aufgrund ihrer Cysteinanteile (C) in verschiedene Klassen eingeteilt [49, 74]. Diese Klassen werden in C, CC, CXC oder in CX3C Subtypen unterteilt, wobei das X für jede beliebige Aminosäure steht. Das FKN oder auch CX_3CL1 wurde als einziges dem CX3C Subtypen zugeteilt und gilt als der einzige Vertreter dieser Gruppe [49, 74]. Eine weitere Besonderheit des FKN ist, dass dieses Chemokin in einer membrangebundenen und einer löslichen Form vorliegt (Abb. 4). Zusätzlich ist dessen „chemokine domaine of function“ viel elastischer und variabler im Vergleich zu anderen Chemokinen [8, 49, 74, 82]. Die membrangebunde Form dient hierbei für Zellen als Adhäsionsmolekül [49, 74]. Der Amino (N) -Terminus des FKN enthält das CX3C Motif und kann an diesem Ende von dem „tumor-necrosis factor α (TNFα) converting enzyme“ (TACE) abgeschnitten werden [49, 74, 82]. Durch diesen Vorgang ergibt sich die lösliche Form des FKN [49, 74]. Die Expression des FKN findet überwiegend durch die Epithel- und Endothelzellen in Darm statt [104].

Der Fraktalkinrezeptor oder auch CX_3CR1 ist ein “seven-transmembrane G“ Protein gekoppelter Rezeptor, wie es für alle Chemokinrezeptoren üblich ist (Abb.5). Der Rezeptor durchwindet die Zellmembran sieben Mal und ist mit einem molekularen Schalterprotein gekoppelt, welches durch Guanosintriphosphat (GTP) und Guanosindiphosphat (GDP) reguliert wird [49, 74]. Mittels der Magnet Resonanz Methode konnte gezeigt werden, dass das FKN am N-Terminus des CX_3CR1 mit der “chemokine domaine of function“ (funktionale Domäne des Chemokins) bindet [8, 74]. Die Induktion des FKN geschieht in Verbindung mit einer Entzündung [1]. Die Entzündung wird über proinflammatorische Zytokine in Gang gesetzt. Dazu gehören Interferon (INF) γ, TNFα und IL-1β [20, 74]. Die Aktivierung über IL-1β und TNFα erfordern die Stimulation über NFκB oder Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) und Akt (Proteinkinase B) [36, 74].

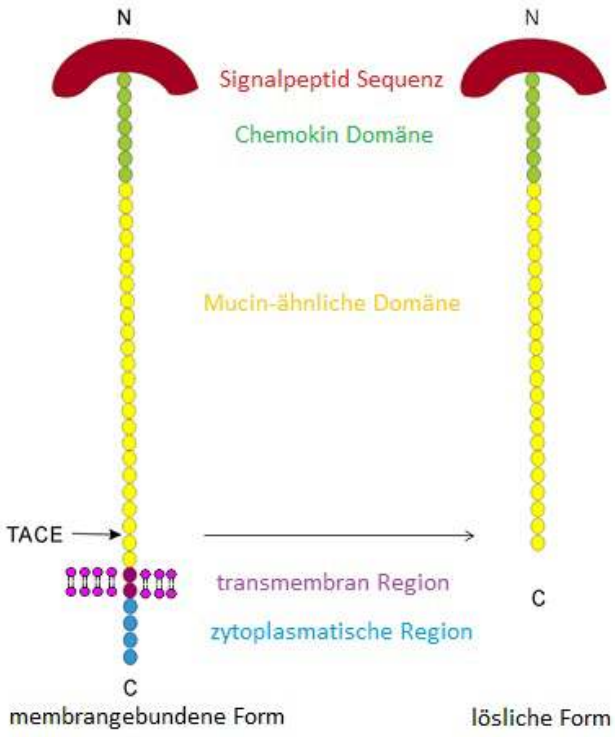


Abbildung 4. Struktur des Fraktalkins (FKN)/ CX_3CL1.

Auf der linken Seite ist die Struktur des membrangebundenen FKN/ CX_3CL1 zu sehen. Durch das Abschneiden der Transmembranregion und der zytoplasmatischen Domäne entsteht rechts die lösliche Form des FKN/ CX_3CL1. [Abkürzungen: C - Carboxy-Terminus; TACE - Tumor-necrosis factor α converting enzyme; N - Amino-Terminus] (Graphik verändert von Liu et. al; *international journal of clinical chemistry*) [74]

Findet die Aktivierung über INFγ statt, wird die Signalkaskade über die Kinasen Januskinase (Jak) 1 und “signal transducers and acvtivators of transcription“ (Stat) 5 durchgeführt. Die Induktion führt zur Transkription von CX_3CR1 und FKN, wobei FNK den eigenen CX_3CR1 Rezeptor und die Eigenproduktion über PI3K, „Mitogen-activated protein kinase“ (MAPK) und Akt hochregulieren kann [20]. Die Inhibition des FKN Signals geschieht über sIL-6Rα [74]. Die Inhibition ist wichtig, um die Funktion und die Balance des FKN aufrecht zu erhalten [20]. Die Stimulation von mononukleären Zellen mit FKN führt zur verstärkten Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, INFγ und IL-6 [104].

CX_3CR1 wird auf Zellen des Immunsystems exprimiert. Wie oben schon beschrieben wird CX_3CR1 auf DZ und MP der KLP exprimiert. Jedoch kann dieser von einer Vielzahl von immunologischen Zellen exprimiert werden, dazu gehören die NK Zellen, Monozyten und T Zellen [99].

Für die Untersuchung des Fraktalkinrezeptors wird die Cx_3cr1-GFP (B6.129P *Cx3cr1*$^{tm1Li\ ttl/J}$) Maus herangezogen. Diese Maus exprimiert das "green fluorescent protein" (GFP) anstelle des CX_3CR1. Die CX_3CR1-GFP Maus stellt somit einen Knockout für den Rezeptor dar. Die Zellen die den Rezeptor exprimieren, dennoch detektiert werden.

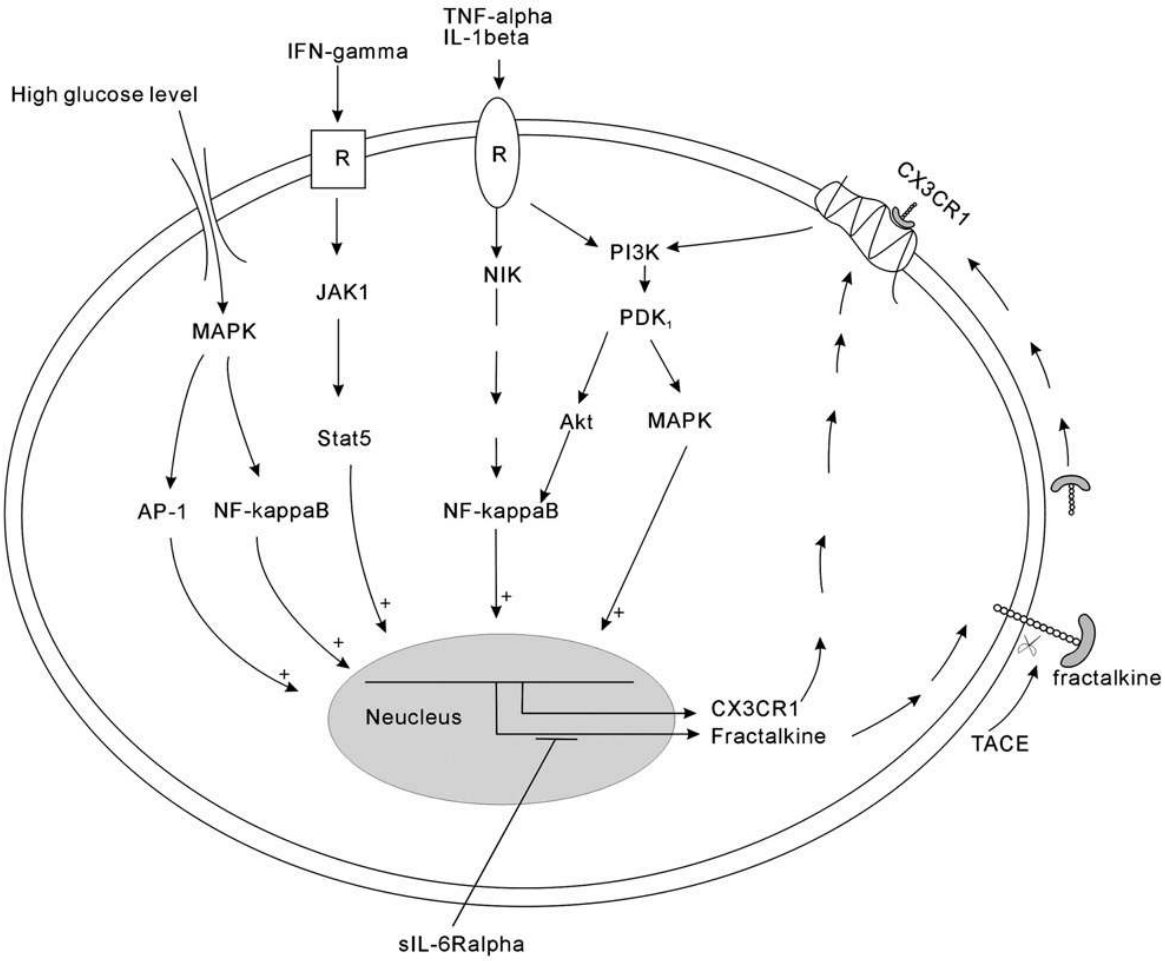


Abbildung 5. Zelluläre Regulation des Fraktalkins (FKN) und des Fraktalkinrezeptors (CX_3CR1).

Die Hochregulation des FKN und des CX_3CR1 findet durch einen hohen Glucoseanteil, durch proinflammatorische Zytokine und durch FKN selbst statt. Diese läuft über "nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells" (NKκB), "adaptor protein" (AP)-1, "signal transducer and activator of transcription" (STAT) und "mitogen-activated protein kinase" (MAPK). Die Inhibition wird durch lösliches Interleukin (sIL)-6 Rezeptor (R) α vermittelt. [Abkürzungen: Akt - Proteinkinase B; Jak - Januskinase; TACE - Tumor-necrosis factor α converting enzyme; TNF - Tumor-necrosis factor; R - Rezeptor; NIK - Nuclear factor-kappa-B inducing kinase; PKD - Proteinkinase D; Phosphoinositid 3-Kinase - PI3K] (Graphik von Liu et. al; *international journal of clinical chemistry*) [74]

Die heterozygote CX_3CR1-GFP Maus hat ein funktionierendes Allel für das CX_3CR1 und eines, dass durch GFP substituiert ist. So kann die Funktionalität des Rezeptors beibehalten und gleichzeitig mittels GFP detektiert werden.
In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass homozygote CX_3CR1-GFP Mäuse eine erhöhte Mortalität bei einer Infektion mit *Listerien* und *Salmonellen* aufweisen [104]. Durch Behandlung mit Dextran sodium sulphat (DSS), welches ein Detergenz ist, und so eine chemische indizierte Kolitis herbeiführt, zeigte sich ein abgeschwächter Verlauf [104]. Der Grund für den abgeschwächten Verlauf in den DSS Experimenten ist, dass der Anteil an proinflammatorisschen Zytokinen wie TNF und IL-6, das durch DZ und MP hergestellt wird, geringer ausfällt [104]. Somit ist auch die Entzündung deutlich schwächer.
Wie diese Versuche zeigen, wurde der Einfluss von des CX_3CR1 in Bezug auf Pathogene wie *Listeria* oder *Salomella* gezeigt. Experimente, wie sich der CX_3CR1 bei einer *C. rodentium* induzierten Kolitis auswirkt, wurden bisher noch nicht beschrieben. Die CX_3CR1-GFP Maus eignet sich gut als *in vivo* Model für die Infektion mit *C. rodentium*. Durch das GFP kann die Entwicklung der Zellpopulation erforscht werden und durch den Knockout kann auch der Bezug auf den fehlenden Rezeptor untersucht werden.

1.7 Aufteilung der antigenpräsentierenden Zellen im Intestinum

DZ und MP spielen beim intestinalen Gleichgewicht eine entscheidende Rolle. Durch diese Zellen findet die Regulation und das Zusammenspiel zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem im Darm statt [50, 104]. Da der Darm permanent mit unterschiedlichen Mikroorganismen in Kontakt steht, wie z.B. mit komensalen Mikrobiota, Fungus, Viren und pathogenen Bakterien, ist es nötig, spezialisierte APZ zu besitzen [104, 146]. Diese APZ werden aufgrund ihres Markerprofils, ihres funktionellen Phänotyps, ihres Migrationsverhaltens und ihrer individuellen Entwicklung beschrieben [104].
Um eine generelle Aufteilung der APZ im Darm durchzuführen, wurden verschiedenen Marker verwendet, die mit den entsprechenden Zellen in Verbindung gebracht werden. Mittels Durchflusszytometrie gelingt es unterschiedliche Marker; die von einer Zelle exprimiert werden, auseinander zu

halten. Somit können die DZ in: (Abb.6): I) plasmazytoide DZ (pDZ), die das Intergrin CD11c und B220 exrimieren, II) konventionelle DZ (kDZ), die CD11c, CD4 oder CD8, exprimieren oder III) kDZ, die nur CD11c exprimieren und für CD4 und CD8 negativ sind, eingeteilt werden [12, 99, 104, 162]. Die III) kDZ, die CD11c positiv, aber doppelt negative für CD4 und CD8 sind, sitzen im Darm und bilden ein komplexes regulatorisches Netzwerk [99]. Die Einteilung dieser DZ findet durch den CX_3CR1 und durch CD103 statt [104].

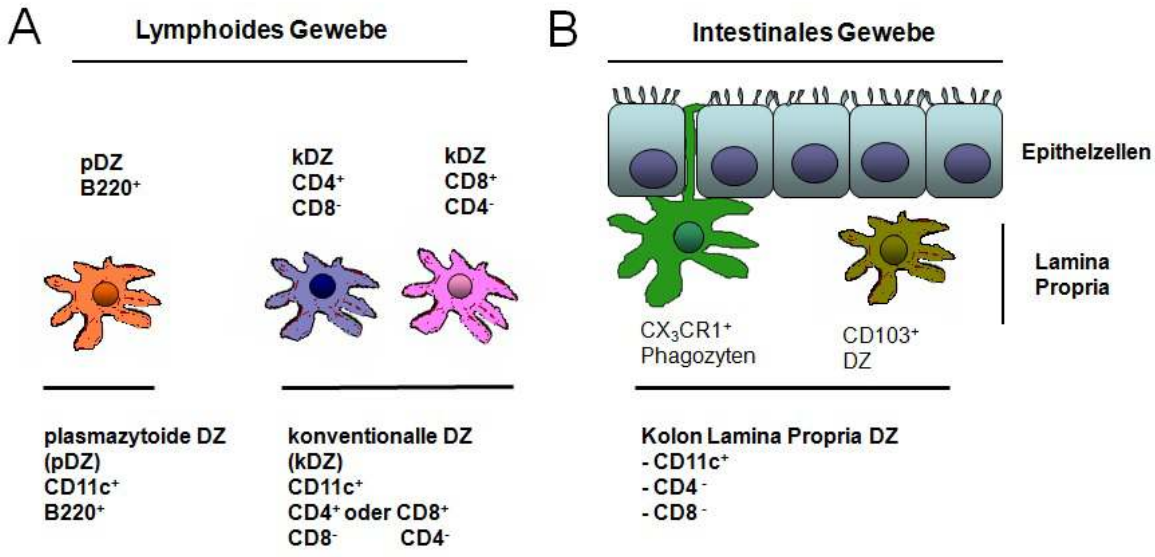


Abbildung 6. Aufteilung der Dendritischen Zellen (DZ).

A. Sind die plasmazytoiden DZ (pDZ) ($CD11c^+$, $B220^+$), konventionelle DZ (kDZ) ($CD11c^+$, $CD4^+$ oder $CD8^+$). **B.** Kolon Lamina Propria DZ ($CD11c^+$, $CD103^+$ oder $CX3CR1^+$). [Abkürzungen: CD – "Cluster of differentiation"; CX_3CR1 – Fraktalkinrezeptor]

CD103 DZ sind in der Lage, in die MLN zu wandern, um dort das „Priming" (erstmalige Aktivierung) von CD4 und CD8 T Zellen durchzuführen. CD103 DZ induzieren CCR9 und das Integrin α4β7 auf CD4 und CD8 T Zellen. Durch die Aktivierung dieser Rezeptoren können T Zellen das Darmgewebe besiedeln [54]. Des Weiteren können CD103 DZ die Differenzierung von T_{reg} hochregulieren [122, 123, 147]. Bisher galt die Theorie, dass CD103 DZ überwiegend T_{reg} hochregulieren. Dies konnte jedoch wiederlegt werden, da in $Batf3^{-/-}$ Mäusen ($CD103^{-/-}$) der Anteil an T_{reg} nicht vermindert war [30, 104]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CD103 DZ auch proinflammatorische Th17 und Th1 Zellen aktivieren können [67, 104]. Die Entwicklung von CD103 DZ ist abhängig vom „FMS-like tyrosine kinase" (Flt) 3 und dem „granulocyte-macrophage-colony-

stimulating factor“ (GM-CSF) [104]. CX_3CR1 Monozyten benötigen den Faktor M-CSF. Zusätzlich exprimieren diese den Marker Ly6C. Es ist jedoch sehr schwierig, diese CX_3CR1^+ Zellen in reine DZ oder MP einzuteilen [104], da CX_3CR1^+ DZ und CX_3CR1^+ MP ähnliche Eigenschaften besitzen, bezogen auf ihre Anpassungsfähigkeit, ihrer Form und Formveränderung. Dies hat zu Schwierigkeiten bei der Beschreibung geführt. Was über CX_3CR1^+ MP bzw. CX_3CR1^+ DZ gesagt werden kann, ist dass diese in Vergleich zu CD103 DZ nicht in die MLN wandern und ein viel schlechteres “Priming“ von naiven T Zellen besitzen [104]. CX_3CR1^+ Monozyten sind in der Lage Th17 Zellen zu fördern und T_{reg} beizubehalten [4, 92, 104]. Die CX_3CR1^+ Monozyten könnten eine Art Sammelstelle von Antigenen aus dem Darm darstellen [104].

1.8 Die Entwicklung der Innate lymphoid cells

ILC sind eine erst von kurzem entdeckte Familie von lymphoiden Zellen [166]. Die Aufgabe der ILC ist einerseits die Bildung und Formgebung von lymphatischem Gewebe, andererseits die Kontrolle der Immun- und Entzündungsreaktion [144, 166]. Diese Zellen gehören zum angeboren Immunsystem und besitzen keine Rezeptorrekombination [166]. Die Immunantwort der ILC spiegelt sich hauptsächlich in der Sekretion von Zytokinen wieder. ILC sind während der Entwicklung vom Transkriptionsfaktor Id2 abhängig [166]. Das bekannte Repertoire an ILC ist mit dem der T Zell Untereinheiten (Th1, Th2, Th17) gleichzusetzen [144, 166]. Erst seit kurzer Zeit sind die Transkriptionsfaktoren der ILC bekannt, so dass man sich ein Bild über die Entwicklung und die Aufspaltung der verschiedenen ILC Populationen machen kann (Abb.6) [144, 166]. Aus den neuen Erkenntnissen resultiert, dass die ILC einen gemeinsamen Vorläufer haben, den “common lymphoid progenitor“ (CmLP) [166].

Aus dem CmLP entwickeln sich drei unterschiedliche Zellpopulationen, die andere Transkriptionsfaktoren aufweisen [166]. Eine Zellpopulation, die sich hieraus entwickelt, sind die konventionellen Natürlichen Killer (kNK) Zellen [163, 166]. Diese Zellpopulation kann Virusbefall und entartete Körperzellen bekämpfen [163]. Hierfür produzieren kNK Zellen INFγ und haben zytotoxische Eigenschaften, um den Befall oder die Entartung einzudämmen. Für die Entwicklung werden IL-15 und die Transkriptionsfaktoren E4BP4/NF-IL3 benötigt [39, 58, 163, 166].

Eine zweite Zellpopulation von ILC, die sich aus dem gemeinsamen Vorläufer entwickeln, benötigt “RAR-related orphan receptor“ (ROR)αt (Transkriptionsfaktor), IL-25 und IL-33 zur Entwicklung [34, 48, 95, 166]. Diese RORαt ILC werden auch als Typ-2 ILC bezeichnet, da diese Type 2 Zytokine sekretieren wie IL-13, IL-5 und IL-9 [16, 34, 116, 166].

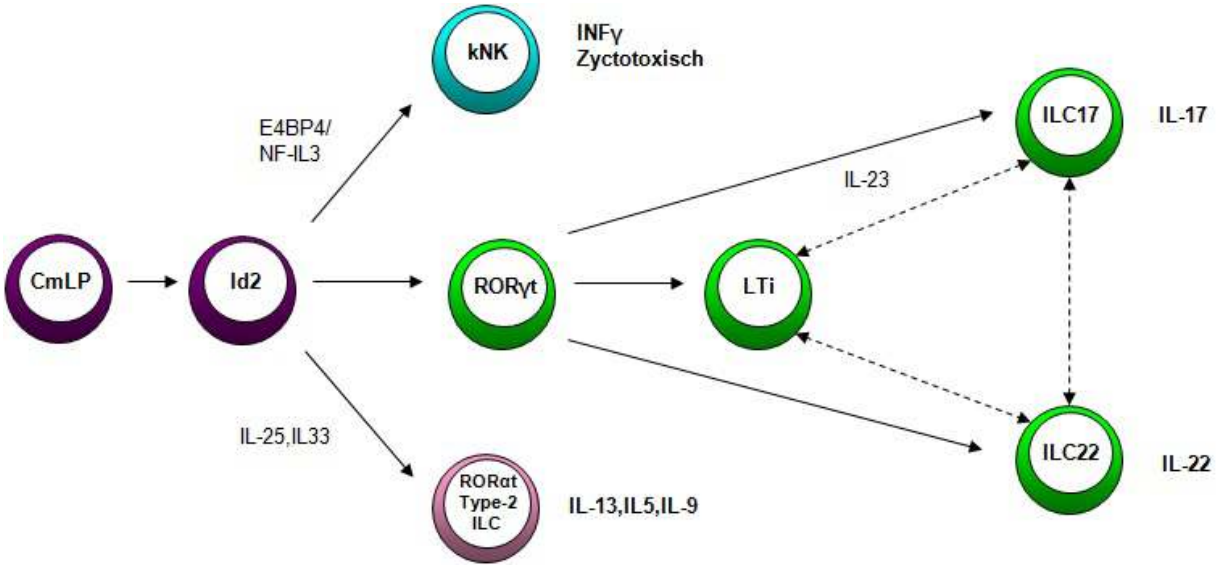


Abbildung 7. Die Familie der “innate lymphoid cells“ (ILC).

Die einzelnen Gruppen der ILC entstehen aus den gemeinsamen Vorläufer, dem “common lymphoid progenitor“ (CmLP). Für dessen Spezifikation wird der “inhibitor of DNA“ (Id) 2 Transkriptionsfaktor benötigt. Aus dem CmLP werden drei unterschiedliche Gruppen gebildet die konventionellen Natürliche Killer (kNK) Zellen, die “RAR-related orphan receptor“ (ROR) γt und die RORαt abhängigen ILC. [Abkürzungen: INF – Interferon; IL - Interleukin; LTi - Lymphoid tissue-inducer; E4BP4/NF-IL3 – Nuclear factor, interleukin 3 regulated] (Graphik verändert von Walker et. al; *Eur J Immunol*) [166]

Typ-2 ILC spielen während der Wurmabwehr und in der Lunge eine entscheidende Rolle [34, 95, 166]. Durch die Sekretion von Typ-2 Zytokinen wird in erster Linie die Inflammation aufrechterhalten, zudem wird das Rekrutieren weitere Typ-2 ILC vollführt [7].

Die dritte Zellpopulation spaltet sich in mehrere Untereinheiten auf, jedoch sind alle Subtypen vom Transkriptionsfaktor RORγt abhängig [144]. Diese Subtypen teilen sich in “lymphoid tissue inducer“ (LTi) Zellen, in ILC17 und in ILC22 auf [144, 166]. LTi Zellen spielen eine Rolle während der Entwicklung des lymphatischen Gewebes sowie bei der Reparatur und Reorganisation des

lymphatischen Gewebes [161, 166]. Die ILC17 und die ILC22 sekretieren IL-17A und IL-22. Diese IL sind bei der Immunantwort im Darm besonders wichtig [18, 166]. ILC17 werden durch IL-23 hochreguliert. Diese exprimieren wiederum IL-17, welches zu einer Inflammation im Darm führt [18]. ILC22 exprimieren nach Stimulation IL-22, wobei IL-22 sowohl als anti- als auch als proinflammatorisches IL fungiert [32]. Die Funktion der ILC22 wird aktuell sehr kontrovers diskutiert und ist nur wenig erforscht. Daher gilt es den Aufgabenbereich und die Mechanismen, in denen diese Zelle involviert ist, genauer zu beschreiben.

ILC22 wurden im Menschen wie auch in der Maus im mukosalen Gewebe wie in der KLP, in den PP und in den MLN gefunden [144].

ILC22 können sich zu ILC17 und LTi Zellen entwickeln (Abb. 7), gleichzeitig können sich ILC17 und LTi Zellen zu ILC22 umwandeln [166]. ILC22 werden durch IL-23 und IL-1β beeinflusst, d.h. diese Zellen exprimieren die entsprechenden Rezeptoren [166]. Das Markerprofil der ILC ist demzufolge CD127, CD25, CD117 (c-Kit) und RORγt [144, 166]. Es ist auch bekannt, dass in der Maus die Modulation der ILC22 durch die kommensale Mikroflora stattfindet, da bei keimfreien Mäusen (keine Darmflora), die Homöostase der ILC22 beeinträchtigt ist. Wie dies geschieht und welchen Einfluss die Mikroflora auf die Regulation der ILC22 hat, ist nicht bekannt [127, 129, 144]. Die Entwicklung der ILC22 an sich scheint in der keimfreien Maus nicht gestört zu sein, da in diesen Mäusen ILC22 zu finden sind [131, 144].

Die meisten Untersuchungen bezüglich ILC22 haben gezeigt, dass diese Zellen besonders in der frühen Abwehr von Kolitis induzierenden Pathogenen wie *C. rodentium* eine wichtige Rolle spielen [107, 129, 144, 180]. Bis dato war noch unklar, welche Zellen tatsächlich die Quellen von IL-22 sein könnten, und ob nicht eher DZ dieses exprimieren [180]. Nähere Untersuchungen haben aber später gezeigt, dass ILC22 die einzige potenzielle Quelle von IL-22 während der frühen angeborenen Immunantwort darstellt [129, 130].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ILC22 besonders in der führen Phase einer mukosalen Infektion die Quelle von IL-22 ist. So wurde von Zheng et. al. 2008 [180] gezeigt, dass IL-22 bei einer *C. rodentium* Infektion in den ersten Tagen post Infektion besonders wichtig ist und dessen Expression einen Peak aufweist.

1.9 Die Rolle von IL-22 im Intestinum

IL-22 gehört zur IL-10 Familie der Zytokine [180]. Das IL-22 wird von Leukozyten, aber vor allem von Th17 Zellen und von ILC22 produziert [148, 166]. IL-22 spielt eine wichtige aber noch unklare Rolle bei der Abwehr von Bakterien [179]. Die IL-22 Expression ist stark abhängig von IL-23 [148], aber auch von IL-1β [69].

Das Signal wird mittels IL-22 Rezeptor (IL-22R) vermittelt (Abb. 8), wobei dieser mit IL-10Rβ gekoppelt ist [64, 120, 180]. Die IL-10Rβ Kette wird gelegentlich auf epithelialem Gewebe exprimiert, IL-22R hingegen wird spezifisch auf den Zellen des Epithels exprimiert und übernimmt regulatorische Aufgaben des epithelialen Immunsystems [69].

Der IL-22R muss für seine Funktionsfähigkeit einen Komplex aus zwei Ketten (IL-22R1 und IL-10Rβ) bilden [64]. Für die Signaltransduktion in der Zelle nutzt die IL-22R Kette eine Januskinase (Jak) und die IL-10Rβ Kette eine Tyrosinkinase (Tyk) 2 [64]. Die Signaltransduktion in der Zellen findet über die Stat3 Kinase statt [64]. Stat3 rekrutiert weitere Stat Kinasen, die im Zellkern einen Transkriptionskomplex bilden. Der Stat Transkriptionskomplex setzt sich aus Stat3, Stat1 und Stat5 zusammen [64]. So kann IL-22 seine Expressionskontrolle entfalten, wobei die Rolle von IL-22 derzeit noch umstritten ist. In vielen Modellen hat IL-22 eine protektive Rolle, dabei wird es ohne vorhandene Infektion ausgeschüttet [107]. IL-22 schützt das Gewebe, indem es zur Hochregulation von Faktoren führt, die für Wundheilungsprozesse wichtig sind [107]. Dadurch wird die Barrierefunktion des Epithels erhöht [107]. In anderen Modellen ist IL-22 proinflammtorisch und somit erst während einer Infektion wichtig. IL-22 kontrolliert dabei die Expression so genannter antimikrobiellen Peptiden oder auch Defensine genannt [125, 126, 157, 180]. Diese sind dann in der Lage, Mikroben zu bekämpfen.

Antimikrobielle Peptide sind in höheren Vertebraten, Pflanzen und auch in Insekten zu finden [41]. Diese Peptide besitzen innerhalb der molekularen Struktur drei bis vier Disulfidbrücken, welche durch Cysteine gebildet werden [41]. Aufgrund dieser Cysteine werden die mikrobiellen Peptide in zwei Gruppen eingeteilt, in α- und β- Defensine [9, 25, 41]. α-Defensine werden von unterschiedlichen Leukozyten und von intestinalen Becherzellen sekretiert. β-Defensine werden von Epithelzellen sekretiert [41].

Defensine haben gegen gram-positive und gram-negative Bakterien, Fungi und verschiedene Parasiten eine antimikrobielle Wirkung, wobei der Wirkmechanismus der Defensine sehr unterschiedlich sein kann [41, 176].

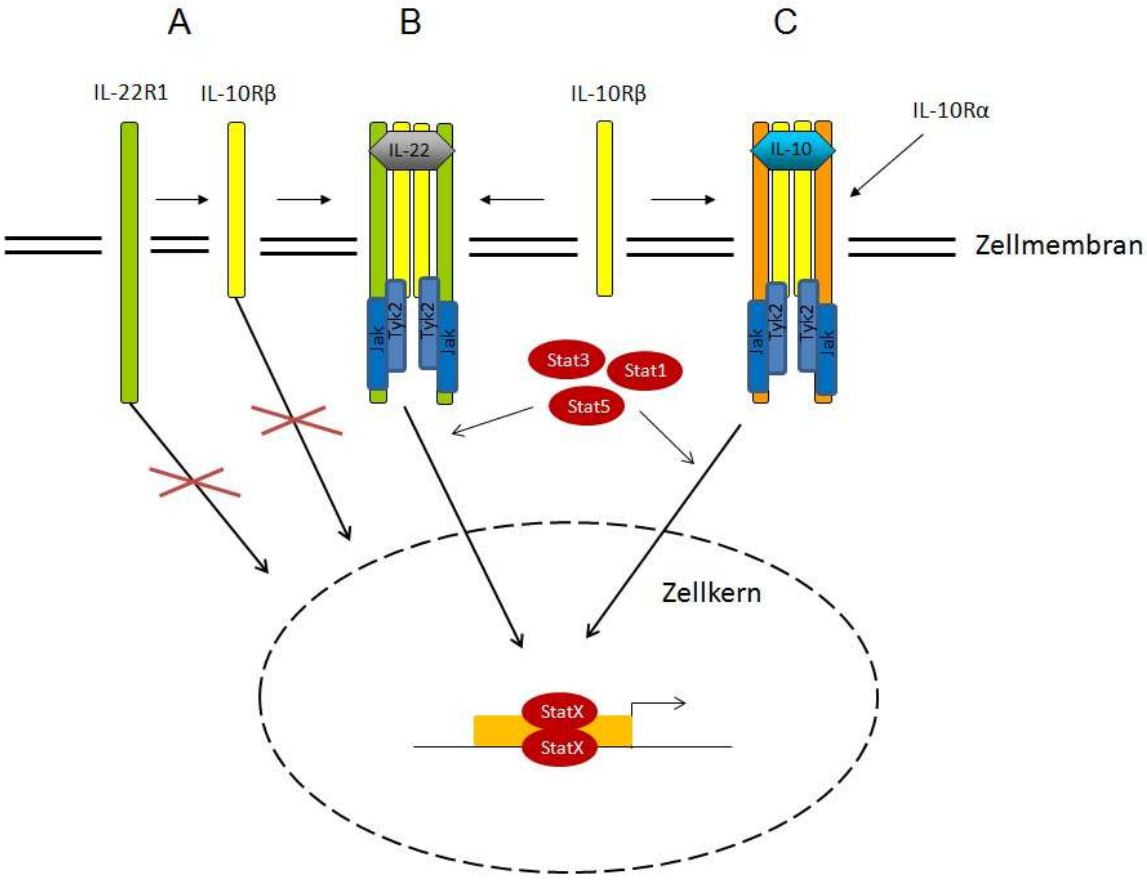


Abbildung 8. Modell des Interleukin-22 Rezeptors (IL-22R) und dessen Signaltransduktion. **A.** Der IL-22R setzt sich aus zwei verschiedenen Rezeptorketten zusammen, dem IL-22R1 und der Interleukin-10 Rezeptor (IL-10)β. **B.** Die IL22R Kette ist mit der Januskinase (Jak) und die IL-10Rβ Kette mit der Tyrosinkinase (Tyk) assoziiert und bilden den IL-22R. **C.** Die IL-10Rβ Kette wird auch von IL-10R genutzt, indem zusätzlich ein Heterodimer mit dem IL-10Rα gebildet wird, wobei IL-10Rα ebenfalls eine Januskinase nutzt. Beide Rezeptoren sind strukturell sehr ähnlich und aktivieren eine ähnliche Kombination an "Signal Transducers and Activators of Transcription" (Stat) Kinasen. (StatX= Stat3, Stat1 und Stat5) (Graphik verändert von Kotenko et. al; *The Journal of biological chemistry*) [64]

Man geht davon aus, dass durch die Defensine Poren in der Zellwand bzw. Membran des Pathogenes formiert werden, wodurch eine Lyse stattfindet [13, 41, 109]. Die Parameter, unter denen Defensine wirken, sind sehr unterschiedlich. So brauchen mache eine bestimmte Ladung, um an die Oberflächen binden zu

können, oder sie werden erst durch ein bestimmtes pH aktiviert [41]. Manche Defensine haben aber nicht nur eine antimikrobielle Wirkung, sondern sind in der Lage, als Chemokine zu wirken, um beispielsweise DZ anzulocken [103, 135].

1.10 *Citrobacter rodentium* als Infektionsmodell

Citrobacter rodentium trat zum ersten Mal in den 1960ern und 1970ern in den USA und Japan in Erscheinung [111]. Hierbei kam es zu einer Epidemie in den Mausbeständen mit einem gramnegativen Bakterium, das eine starke Kolitis zu Folge hatte [91, 111]. *C. rodentium* wurde am Anfang fälschlicherweise mit dem „murinen enterophatogenic *Escherichia coli*“ (*MPEC*) und *Citrobacter freudii* verwechselt [6, 15, 31, 94, 111]. Erst nach einer DNS-Analyse konnte *C. rodentium* identifiziert werden [76, 134].

C. rodentium ist für Nager hochgradig infektiös. Es führt in diesen zu einer starken Kolitis, die mit einer Hyperplasie des Kolons verbunden ist [111]. Das Bakterium wird über die Nahrung aufgenommen und kolonisiert in der Maus zuerst im Ceacum und Kolon. Dabei befällt es vor allem den distalen Teil des Kolons [111, 170]. Ist die Infektion durch *C. rodentium* bei der Hyperplasie des Kolons angelangt, ist die dadurch folgende Epidemie kaum noch in den Griff zu bekommen [111, 171]. Das Bakterium verbreitet sich danach durch den Stuhl und durch die Umgebung. In vielen Mausstämmen ist der Erkrankungsgrad relativ schwach, eine erhöhte Suszeptibilität ist besonders in jungen und immunsupprimierten Mäusen zu beobachten [111, 159]. Das Bakterium ist aber auch natürlicher Weise in geringen Mengen in der normalen Mikroflora der Maus zu finden [159]. Erst ab einer höheren Konzentration werden die Bakterien für die Maus gefährlich.

C. rodentium ist eng verwandt mit *Escherichia coli* und gehört somit zu den *Enterobacteriacae* [111]. Die Kolonisierung des Darms wird durch das Bakterium mittels eines sogenannten „attaching/ effacing“ (A/E) Läsionsmechanismus durchgeführt [35, 91, 133]. Dieser Mechanismus wird von Bakterium verwendet, um sich an der apikalen Oberfläche der Enterozyten festzusetzen [91, 111]. Die A/E Läsion ist klassischerweise mit der Pathogenität von enterophaogenen *E. coli* (*EPEC*) (geht mit starker Diarrhö vor allem bei Kinder einher) oder dem

enterohämorrhagischen *E. coli* (*EHEC*) (starke Diarrhö und hämolytisches urämisches Syndrom) (HUS) verbunden [59, 91, 111].

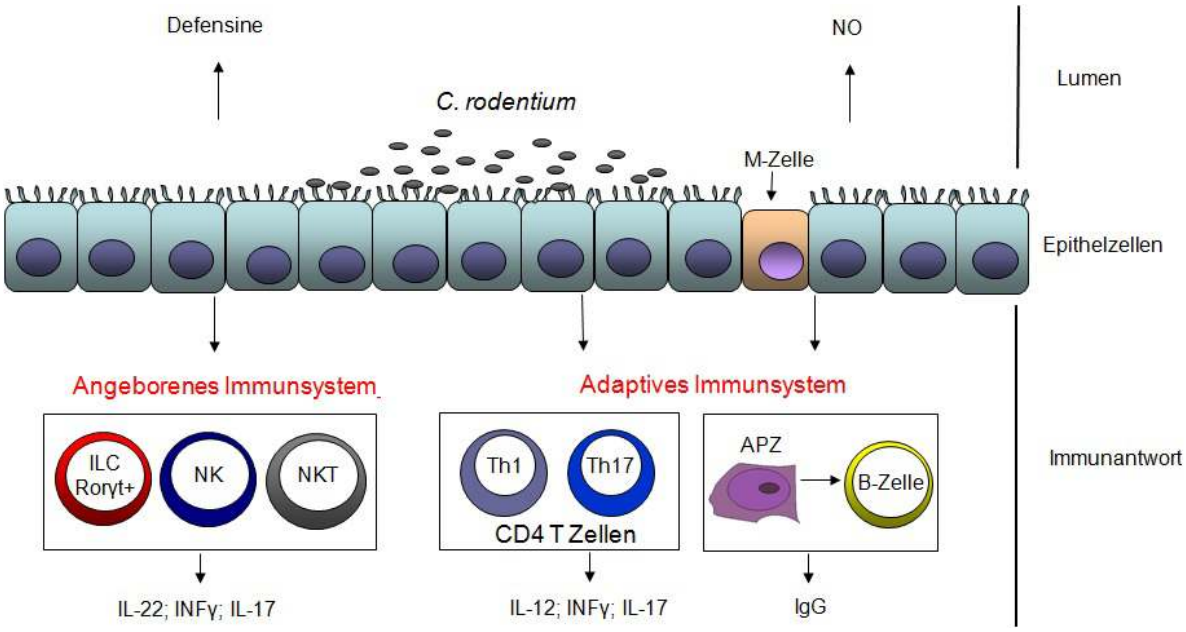


Abbildung 9. Wirkungswege wie *C. rodentium* gekämpft werden kann.
Nachdem *C. rodentium* mit dem apikalen Endothel in Kontakt kommt, werden verschiedene Wege für die Bekämpfung des Pathogenes aktiviert. Zunächst werden die immunologischen Abwehrmechanismen aktiviert, wobei das angeborene und das adaptive Immunsystem mit der Expression proinflammatorische Faktoren beginnt, wie z.B. Interleukin (IL)-17, Interferon (INF)γ, "Tumor necrosis factor" (TNF)α, IL-12 und IL-22. Im Lumen startet die Abwehr durch die Epithelzellen, die Defensine und Stickstoffoxid (NO) sekretieren. [Abkürzungen: APZ – Antigen-präsentierende Zellen; IgG – Immunglobulin G; CD – Cluster of differentiation, ILC – "Innate lymphoid cell"; NK – Natürliche Killer Zelle; NKT – Natürliche Killer Thymus Zellen; T Zelle – Thymus Zellen; Th – Thymus Helfer Zellen; B Zellen – "bone marrow" Zellen; M-Zellen – "Microfold" Zellen; ROR - "RAR-ralated orphan receptor"]

Es kann auf Grund dessen angenommen werden, dass *C. rodentium*, *EPEC* und *EHEC* eine ähnliche Infektionsstrategie und somit auch eine ähnliche Virulenzkassette besitzen. Die A/E Läsionsbildung ist abhängig von der Expression eines Typ III Sekretionssystems, aber auch von anderen Effektorproteinen, die auf so genannten „pathogenicity islands" (PI) kodiert sind [91, 111, 169]. Das PI ist ein 35-kb großer Bereich, auch bekannt als „locus for enterozyte effacement" (LEE) [37, 83, 91, 169]. LEE kodiert ca. 41 Gene, die für die Bildung der A/E Läsion und für die Krankheitsentstehung entscheidend sind [91, 169]. Das LEE von *C. rodentium* ist dem von *EHEC* und *EPEC* sehr ähnlich,

was die Organisation der Genfunktion betrifft, jedoch ist es nicht identisch, weshalb Mäuse gegen *EPEC* und *EHEC* resistent sind [23, 33, 110, 111].

Die Infektion, die durch das *C. rodentium* verursacht wird, ist nicht-invasiv und betrifft somit die apikale Oberfläche des Intestinums der Maus [91, 148]. Diese macht *C. rodentium* zu einem sehr gutem *in vivo* Modell für eine Wirt-Pathogen-Immunsystem-Interaktion. Des Weiteren weist die Infektion mit *C. rodentium* eine starke Ähnlichkeit zu einer CED auf [91, 148].

Die Infektion mit *C. rodentium* in der C57Bl/6 (B6) bzw. Wildtypmaus verläuft wie folgt [148, 170]: Es kommt zu einer schnellen Besiedelung des Kolons, nach Tag 8-10 post Infektion wird ein Hochpunkt (Peak) sichtbar [148, 170]. Das Bakterium wird von B6 Mäusen 20- 22 Tagen nach der Infektion vollständig beseitigt [148, 170].

Der bisherige bekannte immunologische Mechanismus, der zur Beseitigung des Bakteriums führt, läuft über das adaptive Immunsystem (Abb.9). Dies wurde in Knockout Mäusen gezeigt, bei denen die B und T Zellen (Rag $^{-/-}$) fehlen [91, 148, 158, 170]. Weitere Versuche mit Knockout Mäusen haben geholfen, die immunologischen Zellen, die für die Klärung der Infektion mit *C. rodentium* verantwortlich sind, aufzudecken [40, 91]. So konnte gezeigt werden, dass CD4 T Zellen und nicht CD8 Zellen benötigt werden, da ein Knockout von CD8 T Zellen das Überleben der Mäuse nicht beeinflusst. Mäuse, die einen Knockout für CD4 Zellen haben, konnten die Infektion kaum oder überhaupt nicht klären [17, 91].

Es konnte auch gezeigt werden, dass Th1 und Th17 CD4 Zellen eine Rolle bei der Klärung von *C. rodentium* spielten, da der Knockout dieser Zellen in Mäusen eine schlechtere Klärung des Bakteriums zufolge hatte [43, 44, 91, 136, 148]. So wurde gezeigt, dass die Infektion mit *C. rodentium* mit einer starken Infiltration von Th1 Zellen, die proinflammatorische Faktoren exprimieren, wie z.B. INFγ, TNFα und IL-12, einhergeht. Es konnte auch beobachtet werden, dass der Anteil an IL-17 und an Th17 Zellen während der Infektion ansteigt und dass IL-17 Rezeptor A und IL-23 Knockout Mäuse stärkere Krankheitssymptome zeigen [44, 136, 148]. Der Anteil an Th2 Zellen, die IL-4 exprimieren, war hingegen nicht erhöht [44, 136].

B Zellen spielen bei der Infektion auch eine entscheidende Rolle, da diese IgG nach der Infektion exprimieren [78, 91, 142]. Fraglich war zu Beginn, wieso ausgerechnet IgG eine Hilfe bei der Infektionsbekämpfung darstellt, zumal IgG nicht im intestinalen Lumen sekretiert wird, wie das bei IgA und IgM der Fall ist

[40, 78, 91]. Die Antwort, warum IgG zur Klärung hilft, ergibt sich, wenn man auf die Interaktion zwischen Epithel und Pathogen schaut [91, 177]. *C. rodentium* zerstört während der Interaktion das Gewebe, welches dadurch für IgG durchlässig wird [91]. Das IgG, welches im Vergleich zu IgA und IgM viel spezifischer und effizienter bindet, kann nun in das Lumen übertreten, um das Bakterium zu neutralisieren [91].

Weitere Mechanismen, die zu Bekämpfung von *C. rodentium* führen, laufen über das angeborene Immunsystem. Diese Mechanismen sind aber bisher nur wenig erforscht und kaum verstanden [91].

Bisher konnte eine Reihe von Defensinen detektiert werden, die eine antimikrobielle Wirkung auf das Bakterium haben und von Epithelzellen exprimiert werden [90, 91]. So ließ sich eine Korrelation zwischen IL-12 Knockout und der Expression von Defensinen ermitteln [40, 91, 160]. Es konnte auch gezeigt werden, dass Stickstoffoxid (NO), welches auch ein Stoffwechselprodukt des angeborenen Immunsystems ist, bei der Klärung des Bakteriums involviert ist. Der Anteil der NO Synthase war in den Epithelzellen erhöht, die Klärung des Bakteriums war bei entsprechendem Knockout verschlechtert [91, 160]. Es ist jedoch nicht bekannt, wie die Zellen des angeborenen Immunsystems hierbei involviert sind [91]. Man weiß jedoch, dass ILC22, ILC17 und NK Zellen eine wichtige Rolle bei Infektionen einnehmen [166, 175]. Diese sind in der Lage, proinflammtorische Faktoren zu exprimieren, die bei der Bekämpfung des Pathogens helfen [166].

Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass *C. rodentium* ein vorteilhaftes *in vivo* Modell für Erforschung von Kolitis darstellt, bei dem ein Pathogen im Vordergrund steht.

1.11 Ziele des Projekts

CX_3CR1 ist ein proinflammatorischer Rezeptor und ein Marker für KLP Phagozyten. Demzufolge sollte dieser Rezeptor bei der Infektion des Kolons mit einem Pathogen eine wichtige Rolle spielen. Um den Einfluss auf diesen Rezeptor auszuarbeiten, werden Infektionsversuche mit *C. rodentium* durchgeführt. *C. rodentium* infiziert das Kolon, und kommt dabei mit der Darmepithelschicht in engen Kontakt. Zwischen den Darmkrypten befinden sich die Ausläufer der CX_3CR1 Phagozyten. Bei der Infektion würde es somit zum unmittelbaren Zusammentreffen des Bakteriums und der CX_3CR1 positiven Zellpopulation kommen. Sollten CX_3CR1 Phagozyten einen Einfluss bei der Infektion mir *C. rodentium* haben, könnte zum ersten Mal dieser Bezug gezeigt werden. Dabei ist es wichtig, dass das Bakterium zur Kolitisinduktion verwendet wird. Eine Kolitis kann zwar auch mit Chemikalien ausgelöst werden, der Vorteil einer bakteriell ausgelösten Kolitis ist jedoch, dass diese vom Organismus bekämpft werden können und der Erreger beseitigt werden kann. So kann generell ermittelt werden, welche immunologischen Mechanismen zur Bekämpfung von Darmpathogenen notwendig sind.

Arbeitspunkte um die Hypothese zu bestätigen:

1) Zur genauen Bestimmung, welche Rolle der CX_3CR1 (Rezeptors) bei der Infektion mit einem Darmbakterium spielt, wurde die CX_3CR1-GFP Maus, welche einen Knockout für CX_3CR1 darstellt, mit *C. rodentium* infiziert.

2) Im Anschluss sollte ermittelt werden, welche Zellen positiv für den CX_3CR1 sind. Im nächsten Schritt sollten diese CX_3CR1 Zellen näher charakterisiert werden.

3) Der zugrunde liegende Mechanismus, der sowohl zur Krankheitsentstehung, wie auch zur anschließenden Klärung des Bakteriums führt, sollten aufgeklärt werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Mauslinien

Für alle Experimente wurden Inzuchtstämme der Linie C57BL/6 (B6), sowie Cx_3cr1-GFP (B6.129P-*Cx3cr1*$^{tm1Li\ tt/J}$) [100, 105], RAG$^{-/-}$ (Rag^{1tm1Mom}) [88] und CD11c.DOG [45] verwendet. Des Weiteren wurden Kreuzungen der Linien Cx_3cr1-GFP x RAG$^{-/-}$ und Cx_3cr1-GFP x CD11c. DOG verwendet.

Rag$^{-/-}$ Mäuse sind stark immundefizient, da diese durch das Fehlen der Rag (Rekombinase) 1 und Rag 2 [88] keine erfolgreiche T und B Zellrezeptorrekombination durchführen können. Dadurch wird das adaptive Immunsystem ausgeknockt [88].

CD11c.DOG Mäuse exprimieren auf CD11c^{+} Zellen den humanen Deptherietoxinrezeptor. Durch die Behandlung mit Diphterietoxin (DT) können diese CD11c^{+} Zellen depletiert werden [45].

Der Großteil der Experimente wurde mit hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP [100, 105] Mäusen durchgeführt. In diesen Mäusen ist der Fraktalkinrezeptor/ CX_3CR1 durch EGFP substituiert und stellt somit ein Knockout für den Rezeptor dar.

Um die Folgen des Fraktalkinrezeptors Knockouts detailliert zu untersuchen, wurden die RAG$^{-/-}$ und CD11c.DOG Mäuse mit CX_3CR1-GFP Mäusen gekreuzt. Aus diesen Kreuzungen ergaben sich drei weitere Mauslinien, die für die Experimente verwendet wurden; I) Cx_3cr1 $^{GFP/GFP}$ x CD11c.DOG, II) Cx_3cr1 $^{GFP/+}$ x CD11c.DOG und III) Cx_3cr1 $^{GFP/GFP}$ x RAG $^{-/-}$.

Alle verwendeten Mäuse, wurden unter spezifisch Pathogen freien (SPF) Bedingungen in der Tierforschungsanlage der Universität Ulm gezüchtet und gehalten. Das Alter der Tiere, liegt sowohl für Männchen als auch für Weibchen zwischen 6 - 12 Wochen. Die Mäuse wurden für die jeweiligen Experimente nach entsprechendem Alter und Geschlecht abgestimmt. Die Durchführung der Experimente lief nach den Richtlinien der lokalen und internationalen Tierhaltungsbedingungen ab.

2.2 Behandlung der CD11c DOG Mäuse mit Diphterietoxin

CD11c.DOG Mäusen wurden für unsere Versuche verschiedene Konzentrationen an Diphtherietoxin (DT) (cat.no. 322326, Calbiochem, Darmstadt, Germany) verabreicht. Für unsere Experimente stellte sich die Konzentration von 30ng/g Köpergewicht als optimal heraus. Bei dieser Konzentration stellt sich keine Toleranz gegen das DT ein, die $CD11c^+$ Zellen können aber dennoch erfolgreich entfernt werden [5, 153].

Die toxische DT Konzentration wird durch tägliche Verabreichung von mehr als 35ng/g Körpergewicht erreicht. Die Mäuse verlieren durch die Überdosis an DT stark an Gewicht und sterben [153]. Die Toleranz hingegen ergibt sich, wenn eine mehrfache Verabreichung von geringen DT Konzentrationen appliziert wird [153]. Bei einer Toleranz können die $CD11c^+$ Zellen nicht mehr mittels DT depletiert werden.

Die Verabreichung des DT für unsere Versuche erfolgt ein Tag vor der Infektion und dann jeden dritten Tag während der Infektion innerhalb der ersten Woche (Postinfektion). Das DT wird vom Standard 1µg/µl in steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf 1µg/ 100µl PBS verdünnt und wird je nach Gewicht intraperitoneal (IP) verabreicht.

2.3 *Citrobacter rodentium* Stamm

C. rodentium kann unter Umständen zu einer Epidemie der Nagerbestände der Tierforschungsanlage führen. Daher unterliegen die Infektionsexperimente mit *Citrobacter rodentium* der Sicherheitsstufe 2. Das Bakterium kann bei fehlerhaftem Umgang auch einen Einfluss auf die menschliche Gesundheit haben und in Ausnahmefällen zu einer Harnwegsinfektion führen [91, 111]. Für unsere Infektionsexperimente wurde der *C. rodentium* Stamm ICC169 verwendet. Dieser Stamm ist im Gegensatz zum Wildtypstamm ICC168 resistent gegen Nalidixinsäure [91, 111]. Die Antibiotikaresistenz ist stabil in der chromosomalen DNS enthalten. Das Bakterium muss deshalb nicht unter ständigem Antibiotikadruck gehalten werde. Es besitzt die gleiche Infektiosität wie der Wildtyp *C. rodentium* [91, 111, 112].

2.4 Die Generierung des rot fluoreszierenden *C. rodentium* (RF-*C. rodentium*)

Für weitere Versuche wurde ein rot fluoreszierender ICC169 Stamm generiert. Hierfür, wurde mRuby mittels des p16S_PT5mRuby Plasmids durch homologe Rekombination in den S16 Locus des Bakterienchromosoms integriert (Abb. 10). Um den entsprechenden p16S_mRuby herzustellen, wird der p16Slux Vektor [121] mit dem Restriktionsenzym PstI (cat.no. ER0611, Fermentas, St.Leon-Rot, Germany) geschnitten, um dem Phelp Promotor und die luxABCDE Gene herauszuschneiden. Das mRuby kodierende Fragment, das „Upstream“ von dem T5 Promotor liegt, wird aus dem pQE-32_mRuby Plasmid mittels KOD Hot Start DNS Polymerase (Merck, Nottingham, UK) und mit den Primern: PT5mRuby_PstI.fwd (5’ AACTGCAGAGGCCCTTTCGTCTTCACC 3’) und PT5mRuby.rev (5’ GCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTGC 3’) amplifiziert [65].

Das PCR Produkt wird mit dem PstI geschnitten, damit es mit dem p16S Plasmid zu p16S_mRuby ligiert werden kann. Um das p16S_mRuby stabil in den *C. rodentium* ICC169 zu transformieren und um somit den rot fluoreszierenden *C. rodentium* (RF-*C. rodentium*) zu generieren, wird eine Elektroporation angewendet.

Die Elektroporation wird in einer 1mm-Küvette (cat.no. 67742, Sarstedt, Sarstedt, Germany) durchgeführt. Die Transformation wird hierfür auf 1,5kV (Volt), 25µF (Farad) und 200Ω (Ohm) eingestellt. Nach der Elektroporation werden die transformierten Bakterien 1 Stunde bei 30℃ regener iert.

Nach der Regenerationszeit werden die Bakterien auf Luria-Bertani (LB) Agar Platten (Agar; Hefeextrakt; Trypton: BD Difco Laboratrories, Detroit, USA) (Natriumchlorid: Merck KGaA, Darmstadt, Germany) mit 300µg/ml Erythromycin (cat.no. E6376, Sigma-Aldrich, St- Louis, MI, USA) selektioniert. Die Erythromycin resistenten Klone werden auf das Vorhandensein des p16S_mRuby durch Plamidisolation mittels eines Mini-Präparation-Kits (cat. no. 51504, Qiagen, Hildesheim, Germany) und anschießendem Restriktionsverdaus untersucht. Die positiven Klone werden anschließend aerob in LB Broth (Hefeextrakt; Trypton: BD Difco Laboratrories, Detroit, USA) (Natriumchlorid: Merck KGaA, Darmstadt, Germany) mit 300µg/ml Erythromycin für 18 Stunden bei 30℃ inkubiert. Diese Kulturen werden anschließend erneut in frischem LB Medium mit Erythromycin

1:1000 verdünnt und für 6 Stunden bei 30℃ inkubier t. Die angewachsenen Bakterien werden dann bei der nicht-permissiven Temperatur (42℃) inkubiert. Die Verdünnungen werden auf LB Agar mit 300µg/ml Erythromycin ausplatiert und ebenfalls bei 42℃ inkubiert.

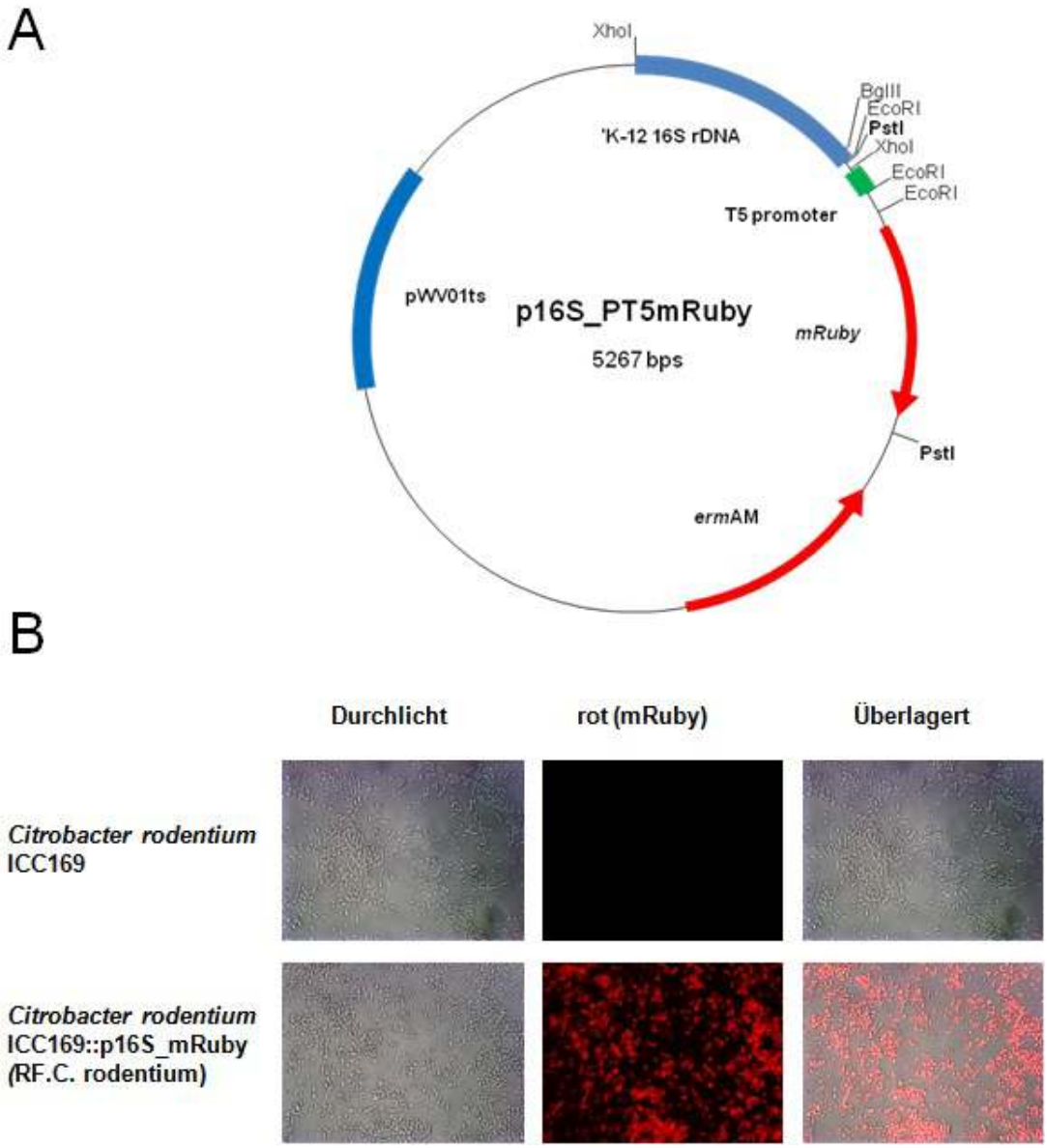


Abbildung 10. Transformation des rot fluoreszierenden *C. rodentium* ICC169.

A. Die Plasmidkarte des p16S_PT5Ruby beinhaltet: die relevanten Stellen für Restriktionsenzyme, das 730 Basenpaar lange Fragment der 16S rDNA Sequenz von *E. coli* K12 (blau), den T5 Promotor (grün), das Gen welches mRuby kodiert, das *ermAM* und die zugehörige Erythromycin Resistenz (rot) und der thermosensitive Ori (orgin of replication) des Plasmids pGh9::ISS1 (blau). **B.** Lichtmikroskopische und fluoreszierende Aufnahmen des *C. rodentium* ICC169 wt und ICC::p16S_mRuby.

Unter nicht-permissiven Bedingungen kann das p16S_mRuby Konstrukt nicht mittels thermosensitiven Orgin (Anfangsstelle der Replikation) vervielfältigt werden. Der 16S Lokus wird somit unter Erythromycinin Selektion und durch homologe Rekombination gezwungen, in das Bakterien Chromosom zu integrieren.
Die selektierten Klone wurden auf Fluoreszenz und Integration des p16S_mRuby Konstrukts mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) getestet.

2.5 *Citrobacter rodentium* Infektion

Alle Schritte für die Infektion werden nach mikribiologischen Standart steril durchgeführt. *C. rodentium* oder RF-*C. rodentium* werden für die Infektion zuerst auf Luria-Bertani (LB) Platten mit 9µg/ml Nalidixinsäure in einem Verdünnungsausstrich ausplattiert und anschließend 18 Stunden bei 37℃ aerob inkubiert. Eine einzelne Kolonie aus dem Verdünnungsausstrich wird entnommen und in eine Vorkultur (5ml LB Medium) gegeben, die erneut aerob für 18 Stunden bei 37℃ inkubiert wird. Somit wird gewährleistet, dass die Kolonie zuerst in einem kleinen Volumen die richtige Bakterienzahl erreicht, um später in der Hauptkultur gut wachsen zu können. Die Vorkultur wird in 95ml LB Medium gegeben und für 18 Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37℃ inkubiert. Die Bakterien werden pelletiert, indem sie für 10 Minuten bei 3000*g* abzentrifugiert werden. Das entstandene Bakterienpellet wird in PBS aufgenommen und erneut für 10 Minuten bei 3000*g* abzentrifugiert. Dieser Schritt stellt sicher, dass sämtliche LB Medium Bestandteile und eventuelle Produkte der Bakterien, die ins Medium abgegeben werden, heraus gewaschen werden. Das Pellet wird in 10ml PBS aufgenommen, um die Bakterienzahl zu bestimmen. Die optische Dichte $(OD)_{600}$ wird mittels Photometer bestimmt, die daraus resultierende Zellzahl kann errechnet werden. Nach erneuter Zentrifugation (3000*g* für 10 Minuten), werden die Zellen auf $1x10^{11}$ kolonieformende Einheiten (CFU)/ml PBS eingestellt.
Die Mäuse, die für die Infektion benutzt werden, sind 6-12 Wochen alt. Die Infektion mit *C. rodentium* wird in einem Sicherheitsstufe 2 Isolator durchgeführt, um mögliche Kontaminationen des Mausbestands zu vermeiden. Damit der Stress für die Mäuse möglichst gering gehalten wird, muss der Transport in den Isolator

7-10 Tage vor der Infektion durchgeführt werden, damit eine Akklimatisierung stattfinden kann. Die Mäuse werden für die Infektion mit 20µl der eingestellten Bakterien ($2x10^9$ CFU) oral gefüttert. Das Gewicht und der klinische Zustand der Tiere werden jeden zwei Tage ermittelt.

2.6 Bestimmung von *Citrobacter rodentium* in Leber, Milz, den mesenterischen Lymphknoten und im Stuhl

Die Organe wie Leber, Milz und die MLN werden aseptisch aus den entsprechenden Mäusen entfernt und anschließend gewogen. Im Anschluss erfolgt mittels Zellsieb eine mechanische Zerkleinerung und eine anschießende Aufnahme in 1ml sterilem PBS. Das unverdünnte Organhomogenat wird, für eine Verdünnungsreihe 1/10 verdünnt. Sowohl vom unverdünnten Homogenat als auch von den Verdünnungen wird ein “spot plating“ angefertigt, d.h. je drei Tropfen zu je 10 µl auf eine LB Platten pipetiert. Die LB Platten enthalten Nalidixinsäure (9µg/ml) (cat.no. N8878-5G, Sigma-Aldrich, St- Louis, MI, USA), da *C. rodentium* resistent gegen Nalidixinsäure ist. Zusätzlich wird Nystatin (0,25 units/ml) (cat.no. 15340-029, Gibco, Garns Island, NY, USA) beigefügt, um Kontaminationen durch Fungus zu vermeiden. Die Platten werden nach dem Auftragen der Tropfen getrocknet und bei 37℃ für 18 Stunden inkubiert. Nach der entsprechenden Inkubation werden die CFU gezählt und auf CFU/g Gewebe umgerechnet.
Um den Infektionsverlauf der Mäuse zu bestimmen, werden alle 2-3 Tage die Stuhlpellets jeder Maus direkt gesammelt. Die gesammelten Pellets werden gewogen und anschließend in 1ml steriles PBS überführt. Das Pellet wird hierfür homogenisiert und 1/10 verdünnt. Das Homogenat und die Verdünnungen werden auf LB Agar Platten mit Nalidixinsäure aufgetragen und für 18 Stunden bei 37℃ inkubiert. Die angewachsenen CFU wurde auf CFU/g Stuhl umgerechnet.

2.7 Konfokale Mikroskopie

Das Kolon von nicht-infizierten Mäusen, von *C. rodentium* und RF-*C. rodentium* infizierten hetero– und homozygote CX_3CR1-GFP Mäuse wird isoliert. Das Kolon wird hierfür geöffnet, gesäubert, auf einen Objektträger gelegt und mit einem Deckglas befestigt. Das lebende Gewebe wird mittels des LSM 710 Konfokalmikroskops (Zeiss, Jena, Germany) untersucht. Die Auswertung der Bilder wird mit der Zeiss ZEM Software (Zeiss, Jena, Germany) durchgeführt. Die Ko-Lokalisation der GFP^+ Zellen und des RF-*C. rodentium* wird ebenfalls mit Hilfe der Zeiss ZEM Software bestimmt. Um die Ko-Lokalisation des GFP und des rot fluoreszierenden Ruby zu ermitteln, wird die Fläche von Interesse eingegrenzt. Das Programm liefert die Verteilung der Punkte innerhalb dieser Fläche. Aus dieser Verteilung kann durch Überlappung der Bildpunkte die Ko-Lokalisation ermittelt werden.
Die weitere Analyse der Bilder wird mittels Zeiss LSM Image Browser (v4.2.0.121) (Zeiss, Jena, Germany) und Adobe Photoshop CS3 durchgeführt.

2.8 Detektion der anti-*C. rodentium* Serum Titer

Hierfür wird das Serum von Mäusen, die *C. rodentium* geklärt haben, entnommen und mittels “enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) analysiert. Für die Detektion des Bakteriums wird *C. rodentium* zuerst auf LB Platten mit 9µg/ml Nalidixinsäure in einem Verdünnungsausstrich aufgetragen. Der Verdünnungsausstrich wird über Nacht bei 37℃ inkubiert. Aus dem Verdünnungsausstrich wird eine Kolonie entnommen, die für die Vorkultur verwendet wird. Die Vorkultur wird, wie oben beschrieben, über Nacht inkubiert und am nächsten Tag für die Hauptkultur verwendet. Die Bakterien, die über Nacht in der Hauptkultur angewachsen sind, werden am nächsten Tag mit 10µg/ml Gentamycine (cat.no. G1397, Sigma-Aldrich, St- Louis, MI, USA) für 1 Stunde bei Raumtemperatur abgetötet. Die Konzentration der CFU/ml wird für den weiteren Verlauf mittels OD_{600} bestimmt. Die Zellzahl der abgetöteten Bakterien wird hierfür auf $1x10^{10}$ CFU/ Well eingestellt und in Maxisorp Immuno Platten (cat.no. 442404; NUNC, Roskilde, Denmark) auf 4℃ über Nacht inkubiert. Im Anschluss wird die Platte mit „bovine serum albumin“ (BSA) (Rinderserumalbumin)

(cat.no. K11-001, Pasching, Austria) Lösung (PBS; 3% BSA) geblockt und mit Waschlösung (PBS; 0,1% Tween) behandelt. Die isolierten Seren der *C. rodentium* infizierten Mäuse, werden hierfür in einer 1/10 Verdünnung auf die Platte ausgestrichen. Zusätzlich wird das Serum von einer nicht-infizierten Maus aufgetragen, dieses dient als Fixpunkt (Negativkontrolle) für die spätere Auswertung. Die Seren werden für 2-3 Stunden auf der Platte inkubiert, so können die Antikörper aus dem Serum spezifisch an das gebundene *C. rodentium* Epitop binden. Nach der Inkubation wird die Platte erneut mit Waschpuffer behandelt und für 30 Minuten mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Ziegenantikörper (cat.no. 554002; BD Bioscience, Heidelberg, Germany) inkubiert. Dieser Antikörper richtet sich gegen Maus IgG. Nach diesem Schritt wird die Platte erneut gewaschen und mit Substrat überschichtet. Bei dem Substrat handelt es sich um 4-Nitrophenylphosphat Disodium Hexahydrat (PNPP) (cat.no. 717768-5G, Sigma-Aldrich, St- Louis, MI, USA), welches in Diethanolamin-Puffer gelöst wird, dass von der Meerrettichperoxidase umgesetzt wird. Die Inkubationszeit beträgt hierfür 10-15 Minuten und resultiert in einem gelblichen Farbumschlag. Der Farbumschlag wird bei 492 nm im Bio-TEK Synergy HT microplate-ELISA Reader gemessen (Bio-TEK, Winooski; Vermont; USA). Die verwendete Software ist die KC4 (v3.1) (Bio-TEK, Bad Friedrichshall; Deutschland).

2.9 Agarose Gel

Das Agarose Gel wird verwendet um DNS entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Je mehr Basenpaare enthalten sind, umso langsamer wandert das DNS Produkt durch die Maschen. Mittels Agarose Gele wird vor allem die Qualität der c (copy) DNS kontrolliert. Für die Herstellung des Gels wird Agarose (cat. no. 15510-027, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) abgewogen, diese wird mit 1x TAE Puffer (Tris: Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA) (Ethylendiamintetraacetat (EDTA): Merck KGaA, Darmstadt, Germany) gemischt und erhitzt. (Die übliche Konzentration für das Gel ist 0,5% Agarose) (1% Gel = 1g Agarose auf 100ml 1x TAE Puffer). Die erhitze Agarose/TAE Mischung wird mit Ethidiumbromid (cat.no. 15585-011, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) versetzt und in eine Gießform gegossen. Das ausgehärtete Gel wird in eine Gelkammer mit Laufpuffer überführt

und mit den Proben beladen. Anschließend wird es bei 120 Volt für 30 Minuten gefahren. Das Gel wird mittels UV im Syngene Apparat (Gen Genius, Bio Imaging Systems, Cambrigde, UK) bestrahlt und mit der Gene Snap Software (v7.07) (Gen Genius, Bio Imaging Systems, Cambrigde, UK) analysiert.

2.10 Detektion mittels quantitativer „Realtime“ (RT) -PCR

Die Gewebeproben, die für die Experimente verwendet werden, müssen zuerst für 30 Minuten in flüssigen Stickstoff gegeben werden, um diese schockzugefrieren. Die RNS wird aus dem gefroren Gewebe isoliert. Hierfür wird das Gewebe mit Hilfe eines Mixers zerkleinert und die RNS mittels RNAeasy mini Kit (cat.no. 74904, Qiagen, Hilden, Germany) isoliert. Die RNS Isolation wird durch sogenannte RNasen erschwert. RNasen befinden sich frei in der Umwelt und sind als Virenschutz erdacht, daher bauen sie freie RNS in der Umwelt sofort ab.
Dadurch ist die RNS Isolation äußerst instabil. Somit muss bei allen Schritten während RNS Isolation äußerst sauber gearbeitet werden. Zusätzlich müssen alle verwendeten Utensilien mit 1% Sodiumdodecylsulfat (SDS) gereinigt werden, um RNasen zu blockieren, die das Produkt abbauen könnten. Die enthaltene genomische DNS wurde mit dem RNase-free DNase I Kit (cat.no. 1010395, Qiagen, Hilden, Germany) zerstört. Die Konzentration der isolierten RNS, aus dem Gewebe, wird mittels Nanodrop 1000 (Thermo, Fisher Sientific, Ulm, Germany) und der Software ND-1000 (v3.7.1) (Thermo, Fisher Sientific, Ulm, Germany) ermittelt. Alle Proben werden anschließend auf 2µg/10µl eingestellt. Die RNS wird im nächsten Schritt mit einem reversen Transkriptase Kit namens SuperScript II (cat.no. 18064-014, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) und „Random Primern“ (cat.no. 48190-011, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) in cDNS umgeschrieben.
Im ersten Schritt werden, die dNTPs (cat.no. NO4475, New England Biolabs, Frankfurt, Germany) und die „Random Pimer“ mit der RNS für 5 Minuten bei 65℃ inkubiert. Im zweiten Schritt, wird durch Zugabe von SSII reverser Transkriptase für 50 Minuten, bei 42℃ und für 15 Minuten, bei 70 ℃, die RNS in cDNS umgeschrieben. Die transkribierte cDNS wird auf 4℃ gekühlt, um die Reaktion zu stoppen. Die umgeschriebe cDNS kann anschließend, mittels PCR mit β-Actin Primer kontrolliert werden. Das β-Actin dient als Kontroll-Gen, da es ein so

genanntes „housekeeping“ Gen ist, d.h. es wird ständig in jeder Zelle expimiert. Für die Kontroll-PCR werden 100pmol/µl des „forward“ β-Actin 61 Primers (Thermo, Fisher Sientific, Ulm Germany) und 100pmol/µl des „reverse“ β-Actin 62 Primers (Thermo, Fisher Sientific, Ulm Germany) eingesetzt, zusätzlich wird der PCR-Mix aus dem Hot Star Taq Plus Mastermixkit (cat.no. 203645, Qiagen, Hilden, Germany) dazugegeben. Der Ansatz läuft über 30 Zyklen in der PCR Maschine (Biometra, T Gradient, CA, USA). Folgende Bedingungen werden für die PCR benutzt: 95℃, 2 Minuten, Wiederholungen 1; 94° C, 1 Minute Wiederholungen 30; 58℃, 1 Minute, Wiederholungen 3 0; 72℃ 1,5 Minuten, Wiederholungen 30; 72℃, 3 Minuten, Wiederholungen 1; 4℃ Ende des Programms.

Der PCR Ansatz wird, nach dem Durchlauf, auf ein 0,5%iges Agarose Gel aufgetragen. Im Gel können die Banden für β-Actin ermittelt werden, somit lässt sich eine erfolgreiche Transkription in cDNS belegen.

Die cDNA kann nun für den quantitativen Nachweis mittels quantitativer Realtime (qRT)-PCR verwendet werden. Für die qRT-PCR werden spezielle 96 well Platten (Fastoptical 96- Well Reaction Plate 0,1) (cat.no. SG41311-5B, MicroAmp, Foster City, CA, USA) verwendet. Aus den zu untersuchenden Primern und den Kontrollprimern wird mit SYBER Green (cat.no. PA-012-12; SABiosciences, Valencia, CA, USA) zwei verschiedene Master Mixe zusammengestellt.

Der Master Mix dient der Detektion und der Amplifikation. Die Mischungen werden in Duplets auf die 96 Well Platte aufgetragen, die cDNS wird anschließend zum Master Mix dazugegeben.

Die fertige 96 Wellplatte, wird für die qRT-PCR in einem 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt; Germany), bei folgenden Bedingungen gemessen: 50℃, 2 Minuten, Wiederholung en 1; 95℃, 10 Minuten, Wiederholungen 1; 95℃, 15 Sekunden, Wiederholungen 1; 60℃, 1 Minute, Wiederholungen 40; 95℃, 15 Sekunden, Wiederholunge n 1; 60℃, 1 Minute, Wiederholungen 1; 95℃, 15 Sekunden, Wiederholungen 1; 60℃, 1 Minute, Wiederholungen 1.

Auch hier dient das β-Actin als „housekeeping“ Kontroll-Gen, mit dem das zu untersuchende Gen verglichen werden kann.

Die einzelnen Werte der cDNS, die aus den infizierten Mäusen gewonnen werden, werden mit Durchschnittswerten von nicht-infizierten Mäusen verglichen.

Folgende Primer wurden mittels qRT-PCR Untersucht:

Tabelle 1. Primer die für die quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) verwendet wurden.

Angeben wird der Primer, die Katalognummer, die Länge in Basenpaaren (Bp) und der Hersteller bzw. die Sequenz. [Abkürzungen: IL- Interleukin; CX_3CL1 – Fraktalkinligand; Muc – Mucine]

Primer / Gen	**Katalognummer**	**Länge**	**Firma / Sequenz**
β-Actin	PPM02945A	154Bp	Qiagen, Hilden; Deutschland
REG IIIγ	QT00147455	93Bp	Qiagen, Hilden; Deutschland
REG IIIβ	QT00239302	141Bp	Qiagen, Hilden; Deutschland
CX_3Cl1	PPM0959E	113Bp	Qiagen, Hilden; Deutschland
IL-1β	_	26Bp	(forword) (CTC AAT GGA CAG AAT ATC AAC CAA CA)
IL-22	PPM05481A	99Bp	Qiagen, Hilden; Deutschland
IL-12p40	_	28Bp	forword) ACT TGA AGT TCA ACA TCA AGA GCA GTA G)
IL-12p19	QT01663613	80Bp	Qiagen, Hilden; Deutschland
mMuc1	_	158Bp 159Bp	(forword) (CTT TCA GAA GAC TCC GCC AG) (reverse) (GGC CAA GAC TGA TTC AGA GC)
mMuc3	_	160Bp 161Bp	(forword) (GAG ACA TGC AAG AAG GAG GC) (reverse) (CCA AGT CCA TAC ACC AGG CT)
mMuc4	_	162Bp 163Bp	(forword) (CCC GCT CAT CCA CTA TC) (reverse) (TGG CCT CCA TTG TGA C)

Der Durchschnittswert wird vom gemessenen Wert abgezogen, dies entspricht dem ddCT Wert. Der ddCT Wert wird in die Formel $2^{(-ddCT)}$ eingesetzt. Die Formel beinhaltet den Bereich indem der lineare Anstieg vorhanden ist und somit die PCR quantitativ ist.

2.11 Isolation von Blutzellen

Ein Volumen von 50µl Blut wird pro Maus entnommen. Das entnommen Blut wird mit 50µl 0,5 Molar EDTA versetzt, um die Blutgerinnung zu verhindern. Anschließend wird es mit Lysepuffer (Tris: Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA) (Ammoniumcholid: Merck KGaA, Darmstadt, Germany) für 5-10 Minuten bei 37℃ inkubiert, so werden die Erythrozyten lysiert. Der Vorgang darf nicht länger als 15 Minuten durchgeführt werden, da die Lyse sonst unspezifisch wird und auch Lymphozyten betrifft. Nach der Lyse werden die Zellen mit PBS gewaschen, falls das Pellet noch zu viele rote Bestandteile beinhaltet, kann der obige Vorgang wiederholt werden. Wenn das Zellpellet komplett grau/weiß ist, kann von einer guten Erythrozytenlyse ausgegangen werden. Die Zellzahl wird anschließend mittels Trypanblau (cat.no. Biochrom AG, Berlin, Germany) bestimmt. Durch das Trypanblau werden tote Zellen blau gefärbt, lebende Zellen nehmen keine Färbung an, so dass nur diese beim Zählen berücksichtigt werden.

2.12 Fluoreszenzmikroskopie und Agglutinin Färbung

Die Kolongewebeproben werden, nach der Isolation aus der Maus, für 30 Minuten in flüssig Stickstoff schock gefroren. Die gefroren Proben werden später mittels Kryosektion (bei -20℃), längs des Kolons in 4-6µm Stücke geschnitten. Diese werden auf Objektträger gegeben. Das geschnittene Gewebe wird für 10 Minuten bei 4℃ in Aceton fixiert und im Anschluss kurz in 4℃ kaltem PBS gewaschen. Die Gewebeschnitte müssen nach dem fixieren mit 20µg/ml (Stock: 1mg/ml) Agglutinin (cat.no. W11263, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) für 1 Stunde, bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach der Inkubation werden die Proben mit PBS gewaschen. Die Proben werden nun in 4%iges Paraformaldehyd (PFA) für 3

Stunden bei 4℃ inkubiert. Die Schnitte werden nach fertiger Inkubation erneut mit PBS gewaschen. Anschließend können sie mit Hilfe des Zeiss HBO 100 (Zeiss, Jena, Germany) Fluoreszenzmikroskops und der Sample PCI (v6) (Zeiss, Jena, Germany) Software analysiert werden. Die Bilder werden mit der Image J Software (v1.43u) (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) ausgewertet.

2.13 Zellanreicherung von CD11c Makrophagen durch MACS

Das “Magnetic Cell Sorting“ (MACS) wird verwendet, um Zellen zu depletieren. Dabei werden die Zellen mit einem Antikörper versehen, welcher direkt oder indirekt (mittels sekundärem Antiköper) an magnetische Kugeln gekoppelt ist. Die markierten Zellen werden auf eine magnetische Säule gegeben. Die Zellen verbleiben in der Matrix der Säule.

Für die Anreicherung von CD11c Zellen, können die Zellen direkt mit einem anti-CD11c Antikörper angereichert werden. Sobald der Magnet entfernt wird, können die markierten Zellen aus der Säule heraus gewaschen werden. Dieser Vorgang entspricht einer positiven Depletion.

In unserem Experiment, handelt es sich um eine negative Depletion von CD11c Zellen, dabei werden Zellen die keine MP sind, die aber auch CD11c exprimieren, entfernt. Der Vorteil einer negativen Depletion ist, dass die CD11c Zellen im Anschluss immer noch angefärbt werden können, um durchflusszytometrische Analysen durchzuführen. Dies ist bei einer positiven Depletion schwierig, da CD11c bereits durch den Antikörper gebunden ist. Für die negative Depletion wird eine Antikörpermischung verwendet. Die Antiköpermischung besteht aus I) anti-CD3 Antikörper, welcher an Phycoerythrin (PE) 145-2C11 (cat. no. 553064; BD Biosciences, Heidelberg, Germany) gekoppelt ist, aus II) anti-CD19 Antikörper 1D3 (cat. no. 557399; BD Biosciences, Heidelberg, Germany) und aus III) anti-DX5 Antikörper (cat. no. 130-052-501; BD Biosciences, Heidelberg, Germany), wobei anti-CD19 und anti-CD49b (DX5) direkt an magnetische Kugeln gekoppelt sind (Abb. 11). Hierbei richtet sich der anti- CD3 Antikörper gegen T Zellen, der anti-CD19 Antikörper gegen B Zellen und der anti- DX5 Antikörper gegen NK Zellen. Bevor die Antikörpermischung zu den isolierten Lymphozyten gegeben

werden kann, muss die Zellzahl ermittelt werden. Die Zellzahl wird benötigt, um die entsprechende Menge an Antikörpern zu wählen. Die Zellen werden im ersten Schritt mit 4℃ kaltem PBS gewaschen und pelletiert (500g; 5 Minuten; 4℃). Die Zellzahl wird auf 10^8 Zellen/ml eingestellt und zuerst mit dem anti-CD3 PE zusammengegeben. Die Konzentration beträgt 10µl/ml anti-CD3 PE Antikörpers und wird für 30 Minuten bei 4℃ inkubiert. Die Zellen werden anschließend mit PBS gewaschen und pelletiert (500g; 5 Minuten; 4℃). Im zweiten Inkubationsschritt wird die Antiköpermischung dazugegeben, diese enthält die magnetischen Kugeln. In der Antiköpermischung befinden sich 200µl/ml des anti-PE Antikörpers (cat. no. 130-048-801; Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany), der sich gegen den Farbstoff richtet und somit CD3-positive Zellen depletieren kann. Zusätzlich befindet sich in der Mischung, 100µl/ml des anti-CD19 Antikörpers und 100µl/ml des anti-DX5 Antikörpers.

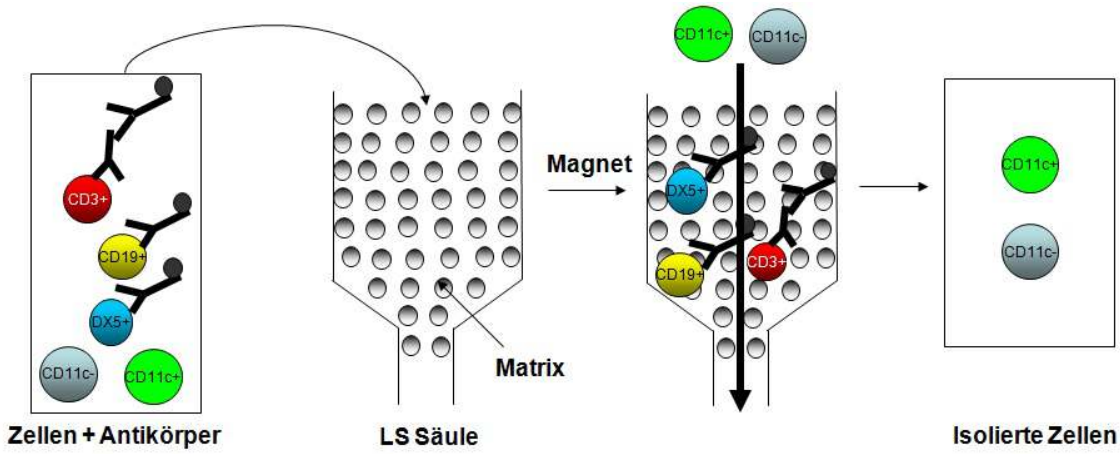


Abbildung 11. Negative Depletion von CD3, CD19 und DX5 positiven Zellen.
Die Zellen, die mit primären und sekundären Antikörper behandelt wurden, werden über die LS Säule gegeben. Die CD3-, CD19- und DX5-positiven Zellen verbleiben in der Matrix, die magnetisch ist. Nicht gebundene Zellen gehen durch die Säule hindurch. [Abkürzungen: CD – "Cluster of differentiation"; DX5 – Antikörper bindet CD49b; LS – Größe der Säule ("Large size")]

Die Zellen werden mit dieser Antiköpermischung für 30 Minuten bei 4℃ inkubiert. Die Auftrennungs-Säule (MACS separation Column 25 LS) (cat.no. 130-042-401, Miltenyi Biotec Inc, Auburn, CA, USA) kann währenddessen am MACS Ständer (quadro MACS) befestigt und mit 2ml PBS eqilibiert werden. So wird sichergestellt, dass die Matrix befeuchtet ist. Nach der Inkubation werden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen (500g; 5 Minuten; 4℃). Die pelletierten Zellen, werden in 1ml

PBS aufgenommen und auf die MACS Säule gegeben. Nachdem die Proben durchgelaufen sind, wird zwei Mal mit je 1ml PBS gewaschen, wobei die Zellen während des gesamten „Sortings“ strikt bei 4℃ gehalten werden müssen. Die Zellen von Interesse durchlaufen die Säule und verbleiben nicht in der magnetische Matrix. Sie können im Durchfluss aufgefangen werden. Die gesorteten Zellen werden zur Kontrolle noch mal mit Trypanblau gefärbt und die Zellzahl wird mittels Zählkammer bestimmt.

2.14 Isolation von Lymphozyten aus der Kolon Lamina Propria

Das Kolon der Mäuse wird entfernt und mit PBS gewaschen, um sämtliche Kot- und Mukosareste zu entfernen. Das gereinigte Kolon wird in 2-3 Stücke zerschnitten und für 30 Minuten bei 37℃ in 1mM DTT und 1mM EDTA in Ca^{2+}/Mg^{2+} freiem PBS, welches mit 1% “fetal calf serum“ (FCS) (fetalem Kälberserum) (cat.no. 10500-064; Gibco, Garns Island, NY, USA) ergänzt wird, bei sanftem Rühren inkubiert. Im ersten Schritt werden kleine Risse sichtbar, diese deuten darauf hin, dass die Lamina Propria frei gelegt wird. Die Gewebestücke werden, nach beenden des ersten Schritts, erneut in PBS mit 1% FCS gewaschen und in kleinere Stücke zerschnitten. Das Gewebe wird anschließend im “Roswell Park Memorial Institut“ (RPMI) 1640 (cat.no. R5886, Sigma, Ayrshire, UK) mit 5% FCS für 30 Minuten bei 37℃ inkubiert. Das Medium wird mit 0,5mg/ml Kollagenase typ VIII (cat.no. C-2139; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und 5U/ml DNase (cat. no. 1284932, Roche, Basel, Switzerland) versetzt. Der trübe Überstand, der sich durch den Verdau mit der Kollagenase ergibt, kann aufgenommen werden. Um sämtliche grobe Gewebestücke zu entfernen, wird der Überstand durch ein Zellsieb gedrückt. Der Überstand kann nun bei 500*g* für 5 Minuten abzentrifugiert werden. Das entstandene Zellpellet wird in einer Mischung aus 2ml RPMI 1640 (mit 5% FCS) und 2ml 70% Percoll (Dichte 1.124g/dl; cat. no. L-6145; Biochrome, Berlin, Germany) aufgenommen. Die entstandene Zellsuspension aus PRMI und Percoll wird in ein Röhrchen gegeben, dass bereits mit 2ml 70%igem Percoll gefüllt ist. So entstehen zwei Phasen, die deutlich voneinander getrennt sind. Die Mischung wird für 20 Minuten bei 750*g* zentrifugiert. Die Zentrifugation wird ohne Bremse und Beschleunigung

durchgeführt, damit soll verhindert werden, dass der Gradient zusammenbricht. Nach der Zentrifugation ergibt sich eine weißlich-trübe Schicht, in der sich die Lymphozyten befinden. Diese werden aus der Interschicht isoliert und anschließend für 10 Minuten bei 750*g* mit PBS gewaschen, um sämtliche Percollreste zu entfernen. Die Zellzahl der isolierten Lymphozyten wird nach dem Waschschritt bestimmt, hierfür werden die Zellen mit Trypanblau angefärbt und in einer Zellkammer unter dem Mikroskop gezählt.

2.15 Durchflusszytometrische Analyse

Die isolierten Zellen werden zweimal mit PBS/ 0,3% BSA (cat.no. K11-001, Pasching, Austria) und 0,1% Natriumazid (cat.no. 30175, Serva, Heidelberg, Germany) bei 4℃ (500 *g*; 5 Minuten) gewaschen. Das Natriumazid verhindert hierbei die Internalisierung der Oberflächenrezeptoren. Um unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper mit Fc-Rezeptoren zu verhindern, werden monoklonale Antikörper 2.4G2 (cat. no. 01241D; BD Biosciences) (Fc-Blockantikörper), die sich direkt gegen den FcγRIII/II CD16/CD32 (0.5 mg mAb/106 Zellen) richten, verwendet. Die Zellen wurden hierfür vor der eigentlichen Färbung mit dem Fc-Blockantikörper für 20 Minuten bei 4℃ inkubiert und anschließend zweimal gewaschen (4℃; 500 *g*; 5 Minuten).

Die Zellen werden nach dem Blocken mit dem eigentlichen durchflusszytometrischen Antikörper für 30 Minuten bei 4℃ gefärbt. Die Antikörper (Stock: 0,2mg/ml) werden hierfür in PBS/ 0,3% BSA/ 0,1% Natriumazid 1:200 verdünnt (Endkonzentration: 0,25µg/ml Antikörper). Nach der Färbung werden die Zellen zweimal mit PBS/ 0,3% BSA/ 0,1% Natriumazid gewaschen (4℃; 500 *g*; 5 Minuten), um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Antikörper, die für die Färbung verwendet werden, sind Phycoerythrin (PE); Allophycocyanin (APC) oder Biotin gekoppelt.

Diese Antikörper sind mit Ausnahme von Biotin direkt mit einem Farbstoff gebunden. Wird ein Biotinantikörper verwendet, muss in einem zweiten Schritt der Farbstoff PerCP-Cy 5.5 (cat. no. 45 4317 82, eBioscience, Frankfurt, Germany) zugegeben werden. Der PerCP Farbstoff ist an Streptavidin gekoppelt, welches wiederum eine sehr hohe Affinität zu Biotin besitzt und somit bindet. Nach der

Inkubation von 15- 25 Minuten bei 4℃ mit PerCP, wird erneut zwei Mal gewaschen (4℃; 500 *g*; 5 Minuten). Die Zellzahl kann anschließend bestimmt werden.

Die oben beschriebenen Schritte sind bei einer reinen Färbung von Oberflächenrezeptoren anzuwenden. Wird eine intrazellulär Färbung durchgeführt, muss eine Stimulation und eine Permeabilisierung der Zellen vorangehen. Für die intrazelluläre Färbung werden die isolierten Zellen und im Anschluss, wie bereits zuvor beschrieben, gezählt. Die Zellen ($1x10^7$/ml) werden anschließend in RPMI 1640 mit 1% Pen/Strep (cat. no. P11010, PAA Laboratories, Pasching, Austria)/ 0,1% β-Mercaptoethanol (cat. no. 60242, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)/ 1% L-Glutamine (cat. no. M110004, PAA Laboratories, Pasching, Austria)/ 10% FCS aufgenommen. Des Weiteren benötigt man für die Stimulation der Zellen einen Zytokinstimulationsmix. Dieser besteht aus 50ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (cat. no. 79346; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), aus 500ng/ml Ionomycin (cat.no. 10634; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und aus 10µg/ml Brefeldin A (cat. no. ALX-350-019-M025; Alexis Biochemicals, Lörrach, Germany). Das PMA und das Iononmycin stimulieren die Produktion verschiedener Zytokine [52, 66]. Das Brefeldin A führt zur Akkumulation der Zytokine im Endoplasmatischen Retikulum [28].

Die Zellen werden für die Stimulation 3 Stunden bei 37℃ inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen mit PBS/ 0,3% BSA/ 0,1% Natriumazid gewaschen (4℃; 500 *g*; 5 Minuten), um sämtliche Reste des Stimulationsmediums zu entfernen. Die Zellen können nach der Stimulation, wie oben beschrieben auf Oberflächenrezeptoren gefärbt werden. Wichtig ist, dass die Oberflächenfärbung vor der intrazellulären Färbung durchgeführt wird, da die Membran hierfür permeablisiert werden muss. Die Zellen werden nach der Färbung erneut mit PBS/ 0,3% BSA/ 0,1% Natriumazid gewaschen (4℃; 500 *g*; 5 Minuten). Für die Permeabilisierung wird PBS/ 0,3% BSA/ 0,05% Natriumazid und 0,5% Saponin (cat.no. 232-462-6, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) verwendet, dabei werden die Zellen für 15-20 Minuten bei Raumtemperatur (25℃) inkubiert. Die Antiköper (Stock: 0,2mg/ml) für die Intrazellulärfärbung werden hierfür in PBS/ 0,3% BSA/ 0,05% Natriumazid/ 0,5% Saponin 1:400 verdünnt (Endkonzentration: 0,1µg/ml) und im Dunkeln für 25-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der intrazellulären Färbung werden die Zellen dreimal mit PBS/ 0,3% BSA/ 0,05%

Natriumazid/ 0,5% Saponin gewaschen und zuletzt einmal mit PBS/ 0,3% BSA/ 0,1% Natriumazid (4℃; 500 *g*; 5 Minuten).
Die gewaschenen Zellen werden in 100µl PBS/ 0,3% BSA/ 0,1% Natriumazid in ein 5ml Polystyrene Round- Bottom Tube (cat. no. 352052, BD Bioscience, Bedford, MA, USA) überführt und anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Der verwendete Durchflusszytometer ist ein FACSCalibur (BD Biosciences).

Folgende monoklonale Antikörper (mAk) wurden für die Oberflächenfärbung verwendet:

Tabelle 2. Antikörperliste für die Oberflächenfärbung.
Angeben wird der Antikörper, der entsprechende Klon, die Katalognummer, das Konjugat und der Hersteller. [Abkürzungen: APC – Allophycocyanin; CD – "Cluster of differentiation"; PE – Phycoerythrin]

Antikörper	Klon	Katalognr.	Konjugiert	Firma
CD11c	N418	17-0114-82	APC	eBioscience, Frankfurt, Germany
CD3	PL61.5	13-0251-81	APC	eBioscience, Frankfurt, Germany
CD25	PL61.5	13-0251-81	APC	eBioscience, Frankfurt, Germany
CD4	L3T4	17-0041-83	APC	eBioscience, Frankfurt, Germany
CD117 (c-Kit)	2B8	12-1171-81	PE	eBioscience, Frankfurt, Germany
CD103	M290	557493	Biotin	BD Bioscience, Heidelberg, Germany
CD3	145-2C11	553060	Biotin	BD Bioscience, Heidelberg, Germany

Um tote Zellen und Zellklumpen auszuschließen wird als zusätzlicher Parameter, die Vorwärts- und Seitwärtsstreuung verwendet. Die Daten werden im

FACSCalibur gemessen und mit FCS Express V3 Software (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA) ausgewertet.

Folgende monoklonale Antikörper (mAk) wurden für die Intrazellulärfärbung verwendet:

Tabelle 3. Antikörperliste für die Intrazellulärfärbung.

Angeben wird der Antikörper, der entsprechende Klon, die Katalognummer, das Konjugat und der Hersteller. [Abkürzungen: APC – Allophycocyanin; IL – Interleukin; PE – Phycoerythrin; ROR - "RAR-ralated orphan receptor"]

Antikörper	Klon	Katalognr.	Konjugiert	Firma
IL-10	JES5-16E3	12-7101-81	PE	eBioscience, Frankfurt, Germany
RORγt	AFKJS-9	12-6988-82	PE	eBioscience, Frankfurt, Germany
IL-22	IC5882P	IC582P	PE	R&D Systems, Wiesbaden, Germany
IL-12/IL-23p40	C17.8	12-7123-81	PE	eBioscience, Frankfurt, Germany
IL22	IC582A	IC582A	APC	eBioscience, Frankfurt, Germany

2.16 Statitische Analyse der Ergebnisse

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wird der ANOVA Test (für nicht parametrische) Daten verwendet, zusätzlich wird der T–Test für zwei ungleich Variablen eingesetzt. $p< 0,05$ wird als statistisch signifikant befunden. $p < 0,005$ wurde als hoch signifikant befunden. N.S. wird als statistisch nicht signifikant befunden.

3. Ergebnisse

3.1 Die Abwesenheit des CX_3CR1 ist mit einer verspäteten Beseitigung von *Citrobacter rodentium* verbunden

Um herauszufinden welchen Einfluss *Citrobacter rodentium* während einer Infektion hat, wurden zunächst C57Bl/J6 (B6) Inzuchtmäuse mit dem Bakterium infiziert. Hierfür wurden die B6 Mäuse mit *C. rodentium* oral gefüttert. Nach der Infektion mit *C. rodentium* kann das Bakterium im Stuhl jeder einzelnen Maus nachgewiesen werden. Mittels der Stuhlproben kann eine Infektionskurve erstellt werden. Für B6 Mäuse konnte ein Hochpunkt (Peak) der Infektion zwischen Tag 10-12 (bei $7x10^9$ kolonieformende Einheiten (CFU)) ermittelt werden, die vollständige Beseitigung des Bakteriums erfolgt zwischen Tag 20-22 (Abb. 12A). Zusätzlich zur Infektionskurve wurde auch das Gewicht der B6 Mäuse während der Infektion ermittelt (Abb. 12B). Die Gewichtskurve verdeutlicht, dass die Mäuse während des Peaks der Infektion, zwischen Tag 10-12, leicht an Gewicht verlieren. Nach dem Infektionshöhepunkt, nehmen diese jedoch wieder an Gewicht zu. Neben der Gewichtsabnahme, die bei den infizierten Mäusen auftritt, lassen sich weitere Symptome, wie Diarrhö und Hyperplasie des Kolons bei diesen Tieren beobachten.

Der Infektionsversuch mit B6 Mäusen war notwendig, um Erfahrungswerte für die Infektion in Knockout Mäusen zu gewinnen. Nach der Infektion in B6 kann ausgesagt werden, dass B6 Mäuse die Infektion überleben und dass diese in der Lage sind *C. rodentium* zu beseitigen.

Als nächste wurde die Infektion mit *C. rodentium* in hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen durchgeführt. CX_3CR1-GFP Mäuse exprimieren GFP, statt des Fraktalkinrezeptors/CX_3CR1 und stellen somit einen Knockout für den Rezeptor dar. Die Infektion der hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäuse mit *C. rodentium* ergab einen ähnlichen Verlauf wie bei den B6 Mäusen, was den Peak der Infektion betrifft, jedoch dauerte die Beseitigung des Bakteriums 5 Tage länger (Abb. 12A).

Bezüglich des Gewichtes konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen B6 und CX_3CR1-GFP Mäusen ermittelt werden (Abb. 12B). Jedoch konnte zwischen

Wildtyp und Knockout in der Infektionskurve ein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Hierbei verhalten sich hetero- und homozygote CX_3CR1-GFP Mäuse ähnlich, sie benötigen für die Beseitigung des Bakteriums einen längeren Zeitraum. Dieser deutliche Unterschied in den Infektionskurven der CX_3CR1 Knockout Mäuse führt zu dem Schluss, dass der CX_3CR1 wohl einen Einfluss auf die Klärung von *C. rodentium* hat.

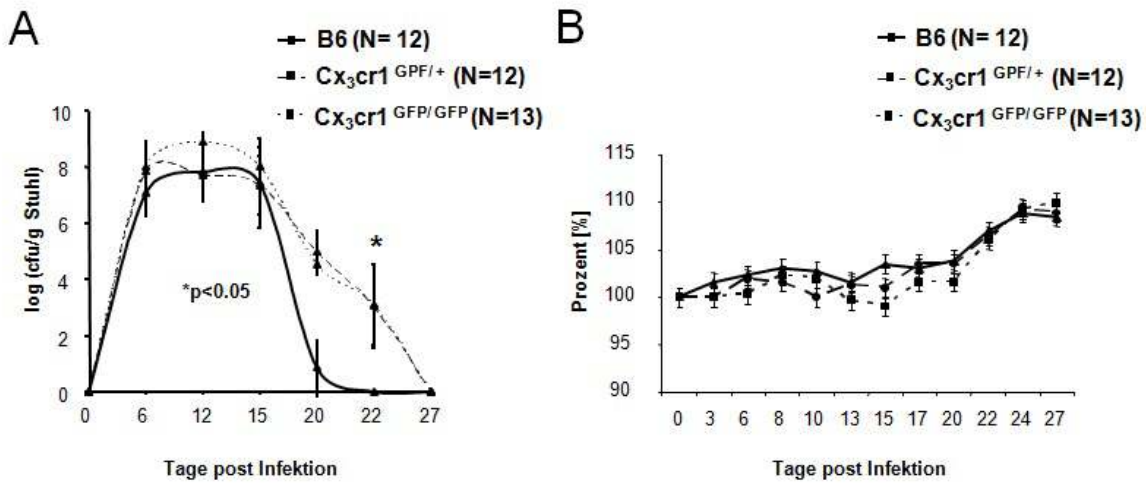


Abbildung 12 Infektionskurve und Gewichtskurve während der Infektion mit *C. rodentium*. **A.** *C. rodentium* Anteil kolonieformender Einheiten (CFU) aus dem Stuhl von B6 (alters- und geschlechtlich- abgestimmt) sowie heterozygoten und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen. Die entsprechenden Stuhlproben wurden jeden 2-3 Tag entnommen. **B.** Die Gewichtskurve infizierter Mäuse weißt einen Knick am Höhepunkt (Peak) der Infektion auf. B6, heterozygote und homozygote CX_3CR1-GFP Mäuse wurden jeden 2-3 Tag während der Infektion gewogen. N entspricht der Anzahl der Mäuse die pro Gruppe verwendet wurden. p Werte wurden mittels eines nicht- parametrischen Student´s t test errechnet; $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant befunden. [Abkürzungen: B6 – C57Bl6 (Wildtyp Maus); CX_3CR1 – Fraktalkinrezeptor; GFP – "Green fluorescent protein"]

Da eine *C. rodentium* Infektion auch mit einer Hyperplasie des Kolons [148] einhergeht, muss untersucht werden, ob dieses gegebenenfalls in CX_3CR1-GFP Mäusen im Vergleich zum Wildtyp vergrößert ist. Um das Krankheitsstadium der Mäuse zu ermitteln, wurde eine makroskopische Analyse des Kolons durchgeführt. Hierfür wurde das Kolon der Mäuse nach der Beseitigung des Bakteriums entfernt, gemessen und gewogen. Abbildung 13 A zeigt jeweils ein repräsentatives Kolon von B6, hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen, nach der Infektion mit *C. rodentium.* Das Gewichts-/Längenverhältnis (Abb. 13 B)

des Kolons der hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäuse zeigt einen signifikant höheren Index, was mit einem stärkeren Erkrankungsgrad verbunden ist. In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob eine Translokation (Einwanderung in Organe) von *C. rodentium* in B6 und in CX_3CR1-GFP Mäusen stattfindet.

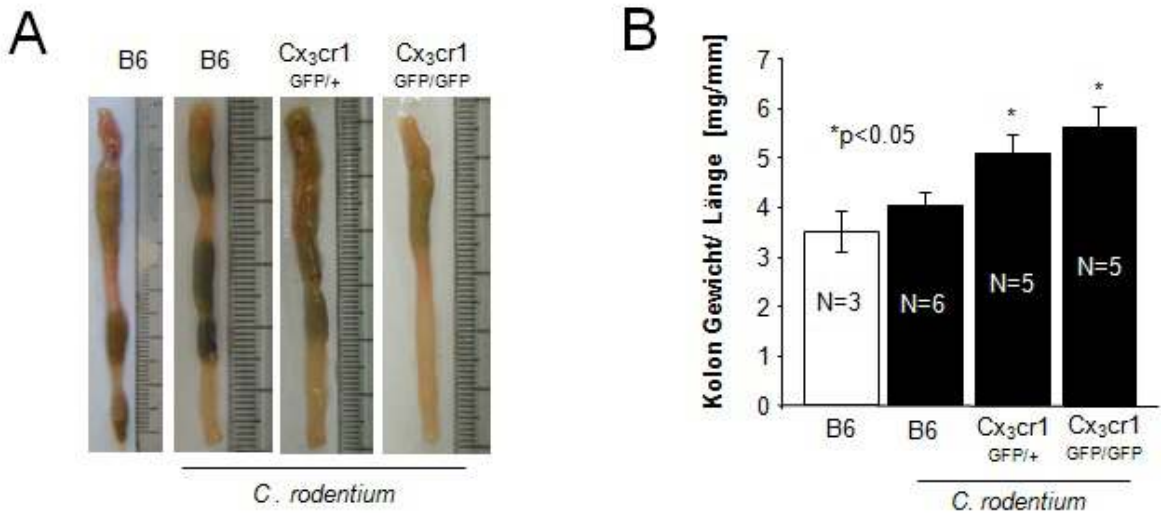


Abbildung 13 Kolonbilder und Kolon Gewichts-/Längenverhältnis während *C. rodentium* Infektion.

A. Am Ende des Infektionsexperiments wurde das Kolon von allen Tieren entfernt und fotografiert. Exemplarisch wurde das Kolon einer negativen Kontrolle (uninfizierte B6), sowie einer B6, $CX_3CR1^{GFP/+}$ und $CX_3CR1^{GFP/GFP}$, welche mit *C. rodentium* infiziert wurden, abgebildet **B.** Das Kolon Gewicht und die Länge wurden nach Ende des Experiments ermittelt und das Verhältnis aus Gewicht/Länge wurde daraus für jede Gruppe errechnet. N entspricht der Anzahl der Mäuse die pro Gruppe verwendet wurden. p Werte wurden mittels eines nicht- parametrischen Student´s t test errechnet; $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant befunden. [Abkürzungen: B6 – C57Bl6 (Wildtyp Maus); CX_3CR1 – Fraktalkinrezeptor; GFP – "Green fluorescent protein"]

Hierfür wurden während der Peakinfektion drei wichtige Organe isoliert: Milz und MLN, die immunologisch eine wichtige Rolle spielen und zusätzlich die Leber, die funktionell, aber auch immunologisch essentiell ist. Abb. 14 zeigt die Transloktion des Bakteriums in den MLN, der Leber und der Milz. Homozygote CX_3CR1-GFP Mäuse zeigen einen signifikant höheren Anteil an CFU. Die Translokation in heterozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen ist nicht signifikant ($p \geq 0{,}05$), dennoch konnten CFU in den Organen gefunden werden. Das ist in allen drei Organen der B6 Mäuse nicht der Fall. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der

Fraktalkinrezeptor/ CX_3CR1 auch bei der Verhinderung der Translokation des Bakteriums, eine entscheidende Rolle einnimmt.

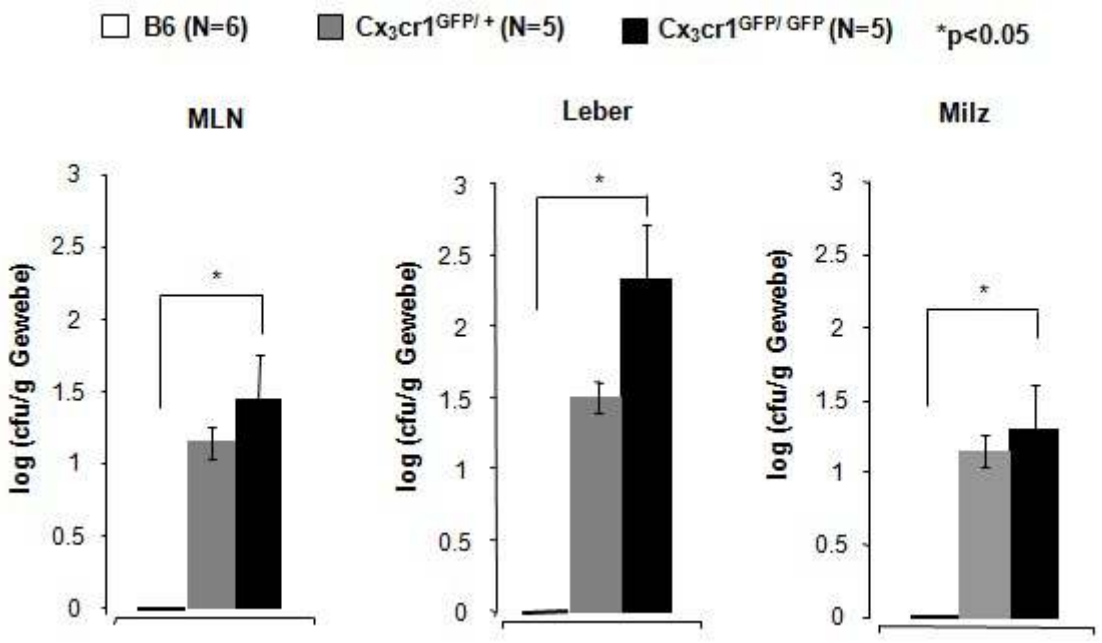


Abbildung 14 Translokation von *C. rodentium* in mesenterische Lymphknoten (MLN), Leber und Milz.

Kolonieformende Einheiten (CFU) die aus Homogenaten der Leber, Milz und den MLN ermittelt wurden. N entspricht der Anzahl der Tiere die pro Gruppe verwendet wurden. p Werte wurden mittels eines nicht- parametrischen Student´s t test errechnet; $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant befunden. [Abkürzungen: B6 – C57Bl6 (Wildtyp Maus); CX_3CR1 – Fraktalkinrezeptor; GFP – "Green fluorescent protein"]

Diese Daten haben gezeigt, dass CX_3CR1 Knockout Mäuse bei der Beseitigung, aber auch bei der Verhinderung der Translokation von *C. rodentium* benachteiligt sind. Des Weiteren zeigen diese einen höheren Krankheitsgrad in Vergleich zu B6 Kontrollen und heterozygoten Tieren.

3.2 CX_3CR1^+ $CD11c^+$ Makrophagen und Fraktalkin werden nach der Infektion mit *C. rodentium* hochreguliert

In den vorherigen Experimenten (Abb. 12-14) konnte festgestellt werden, dass der Fraktalkinreceptor/CX_3CR1 eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von *C. rodentium* spielt. Nun ist zu ermitteln, ob das Fraktalkin/CX_3CL1 und der CX_3CR1

hochreguliert werden. Desweiteren wollten wir wissen, auf welchen Zellen der CX_3CR1 exprimiert wird.

Um herauszufinden, ob das FKN hochreguliert wird, wurden quantitative Realtime (qRT)-PCRs verwendet. Hierfür wurden infizierte Mäuse sowohl während der Peakinfektion (Tag post Infektion (TpI) 12), als auch nach Beseitigung des Bakteriums (TpI 27) mit nicht-infizierten Mäusen verglichen. Das Gewebe wurde proximal in der Nähe des Ceacums entnommen. Die RNA wurde isoliert und im Anschluss in cDNA umgeschrieben. Die qRT-PCR (Abb. 14) verdeutlicht, dass das FKN während der Infektion für alle drei Maus-Gruppen stetig zunimmt. Des Weiteren konnte ermittelt werden, dass auch innerhalb der einzelnen Gruppen das FKN im Vergleich zu den nicht-infizierten Mäusen signifikant zunimmt. Das FKN ist bereits nach dem Gipfel der Infektion signifikant erhöht und steigt während der Klärung des Bakteriums weiter an. Das Ansteigen des FKN Verhältnisses spricht dafür, dass das Chemokin während der Infektion benötigt und aufgrund dessen hochreguliert wird.

Da sich eine Hochregulation von FKN (Abbildung 15) beobachten lässt, stellt sich die Frage, ob der entsprechende Rezeptor auch während der Infektion verstärkt exprimiert wird. Um dies nachzuweisen, wurde das konfokales *ex vivo* Imaging zur Hilfe genommen (Abb. 16C). Hierfür wurde das Kolon von nicht-infizierten und *C. rodentium* infizierten CX_3CR1-GFP Mäuse, während der Peaklinfektion und nach Klärung des Bakteriums entnommen. Abbildung 15C zeigt, dass in hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen, der GFP Anteil steigt und somit auch das Verhältnis an CX_3CR1.

Es ist in der Abbildung deutlich zuerkennen, dass GFP^+ Zellen nach Beginn der Infektion in der Kolon Lamina Propria (KLP) zwischen den Krypten zunehmen. Für die Quantifizierung der CX_3CR1^+ Zellen, wurden hierfür die Lymphozyten der KLP, (wieder von nicht-infizierten und *C. rodentium* infizierten (TpI 12 und 27) hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen) mittels Percollgradient isoliert und mit anti-CD11c. Antikörper gefärbt.

Die Färbung wurde mit CD11c durchgeführt, da CX_3CR1^+ Zellen der KLP Makrophagen (MP) darstellen [100, 105]. Abbildung 16 A und B zeigen, dass in $CD11c^+$ Zellen in der Durchflusszytometer Analyse ein starker GFP Anteil nachweisbar ist. Außerdem lässt sich hier zeigen (Abbildung 16A), dass bei

infizierten Mäusen der GFP Anteil (GFP^+ Zellen) und somit der CX_3CR1 während der Infektion zunimmt.

Abbildung 16B bezieht sich auf die relative Zellzahl für GFP^+ Zellen während der Infektion. Der Vergleich der Zellzahlen GFP^+ Zellen nach der Infektion ergab keine statistisch signifikanter Unterschied zwischen hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen.

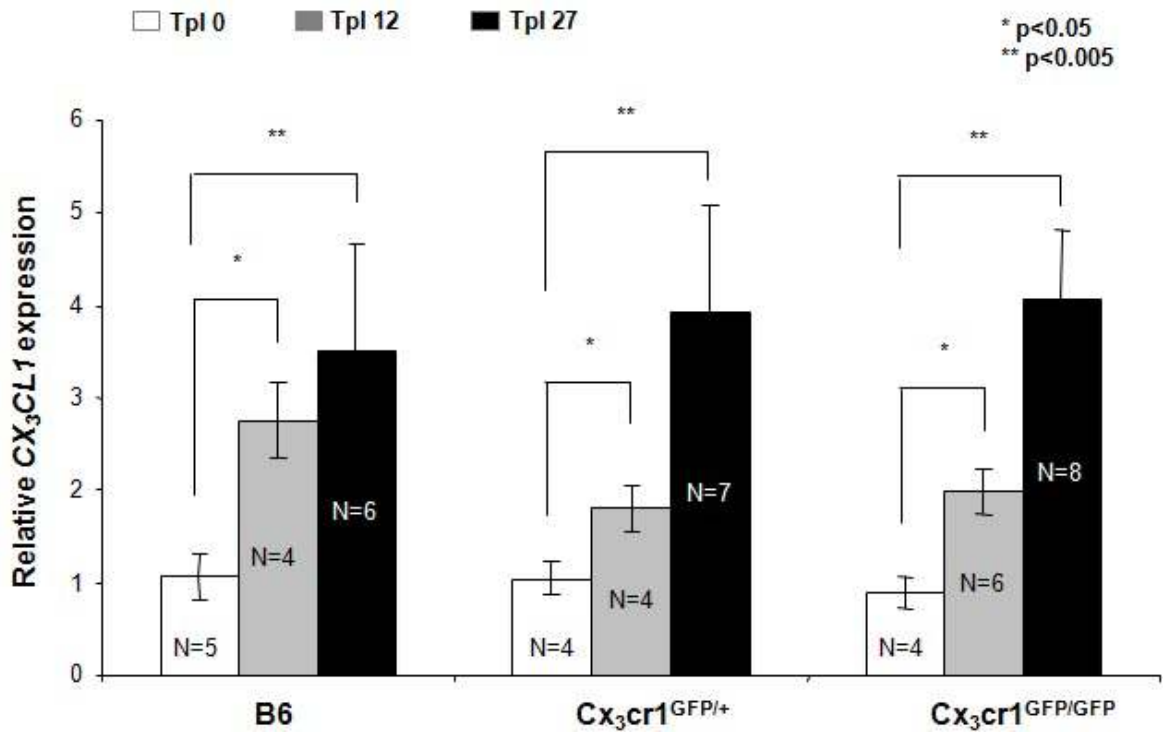


Abbildung 15. Anstieg der Fraktalkin (FKN)/CX_3CL1 Expression in *C. rodentium* infizierten Mäusen.

Aus Kolongewebe wurde die gesamt RNS von nicht-infizierten und mit *C. rodentium* infizierten B6, (alters- und geschlechtlich- abgestimmt), sowie hetero- und homozygot CX_3CR1-GFP Mäuse isoliert und mittels reverser Transkription in cDNS umgeschrieben. Das FKN/CX_3CL1 wurde mittels quantitativer Realtime Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) analysiert. N entspricht der Anzahl der Tiere, die pro Gruppe verwendet wurden. p Werte wurden mittels eines nicht- parametrischen Student´s t test errechnet; $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant befunden. $p < 0.005$ wurde als hoch signifikant befunden. [Abkürzungen: B6 – C57Bl6 (Wildtyp Maus); CX_3CR1 – Fraktalkinrezeptor; CX_3CL1 – Fraktalkinligand; GFP – "Green fluorescent protein"; Tpl – Tage post Infektion]

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie und des konfokalen *ex vivo* Imaging (Abb. 16 A-C) bestätigen somit, dass der CX_3CR1 während der Infektion verstärkt exprimiert wird und dass die Zellen, die es exprimieren auch CD11c positiv sind.

Des Weiteren wurde untersucht, ob im Blut von hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen unterschiedliche Monocyten, Natürlichen Killerzellen (NK), T und B Zellen den Fraktalkinrezeptor exprimieren.

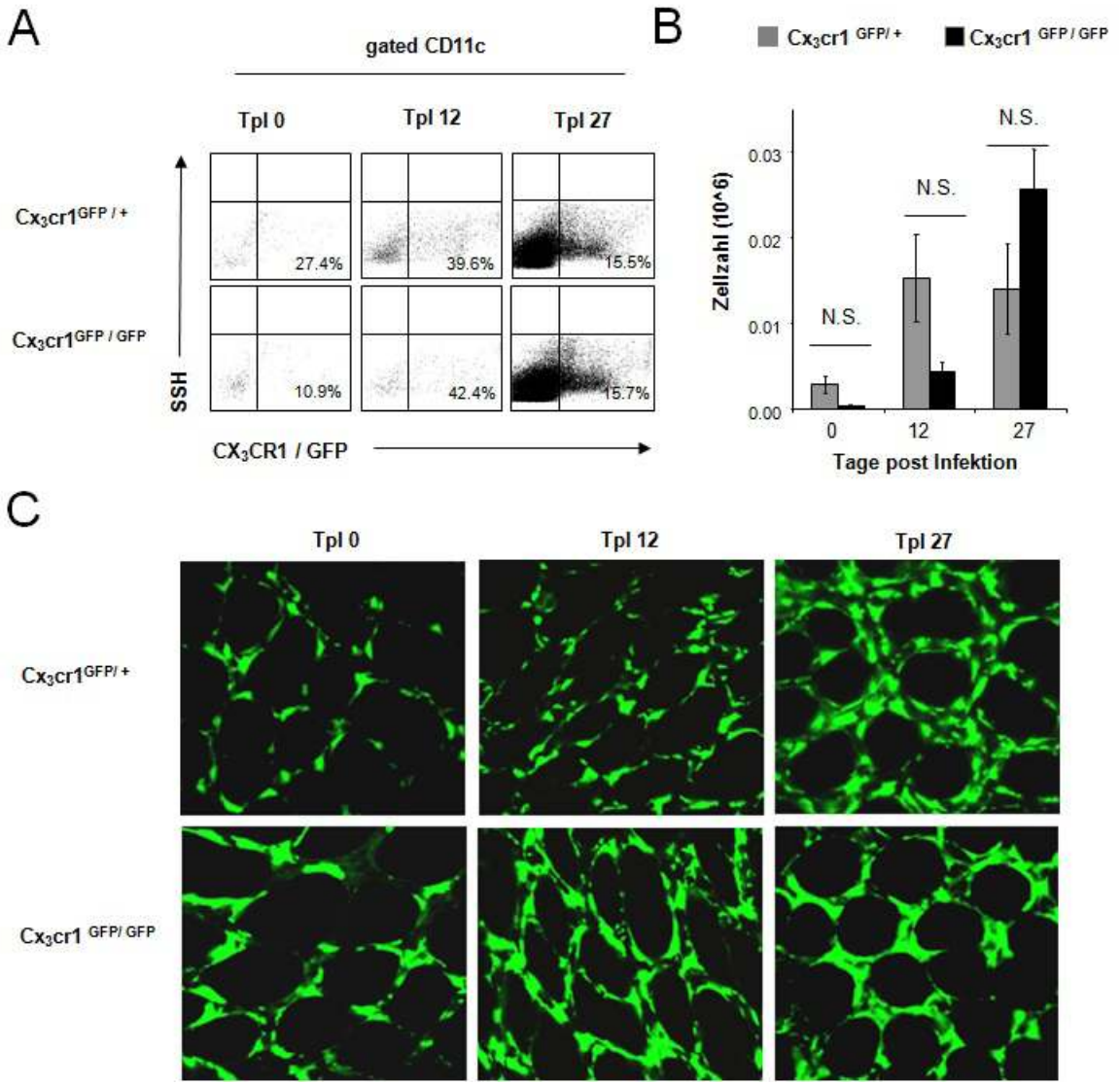


Abbildung 16. Anstieg des Fraktalkinrezeptors/CX_3CR1 im Durchflusszytometer und im konfokalen *ex vivo* Imaging.

A. Bei den entsprechenden Zeitpunkten nach der Infektion wurden die Zellen der Kolon Lamina Propria (KLP) isoliert, mit CD11c gefärbt und mittels Durchflusszytomerie analysiert. Die Zahlen entsprechen den Prozenten, die bei der Messung erreicht wurden. **B.** Die Gesamtzellzahlen, die nach der KLP Isolation gezählt wurden, sind aus hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen dargestellt. p Werte wurden mittels eines nicht- parametrischen Student´s t test errechnet; N.S. wurde als statistisch nicht signifikant befunden. **C.** Konfokale Bilder des Kolons der hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen, die mit *C. rodentium* infiziert wurden. Es sind jeweils Tag 0, 12 und 27 nach der Infektion dargestellt. [Abkürzungen: CX_3CR1 – Fraktalkinrezeptor; GFP – “Green fluorescent protein“; Tpl – Tage post Infektion]

Das entnommen Blut der CX_3CR1-GFP Mäuse wurde lysiert und mit entsprechenden Markern für B, T Zellen und für NK und Monocyten gefärbt. Abbildung 17A verdeutlicht, dass der CX_3CR1 von B (CD19) und T (CD3) Zellen nicht exprimiert wird, jedoch ist für Monozyten (CD11b.) und NK (DX5) in hetero- und homozygoten Mäusen ein GFP Anstieg erkennbar. Die Färbung verdeutlicht die Expression des Rezeptors in den Zellen des angeborenen Immunsystems.
Nun gilt es zu zeigen, dass die MP in der KLP tatsächlich die Zellen sind, die nach der Infektion expandieren. Um die Expansion der MP zeigen zu können, wurden erneut die Lymphozyten der KLP mittels Percollgradienten isoliert und gefärbt. Die Marker, die für diese Färbung gewählt wurden, sollen die Zellpopulation der KLP enthalten. Ein Marker hierfür ist CD11c, es wird auf DZ und MP exprimiert. Zusätzlich wurde das F4/80 gewählt, welches nur auf gereiften MP exprimiert wird, sowie CD103 welches für DZ der KLP charakteristisch ist.
Abbildung 17 B zeigt die Verschiebung von $F4/80^+$ und $CD103^+$ Zellen, welche auf CD11c eingegrenzt worden sind, in nicht-infizierten und in infizierten CX_3CR1-GFP Mäusen. Es ist dabei deutlich zu erkennen, dass eine Verschiebung der Population in Richtung F4/80 stattfindet. Da der CX_3CR1 auf verschiedenen Lymphozyten exprimiert wird, muss bestimmt werden, ob die Zellen, die während der Infektion mit *C. rodentium* ansteigen, auch tatsächlich MP sind.
Es wurde auch untersucht, welche dieser Zellen vor und nach der Infektion mit *C. rodentium* GFP positiv sind. Die Ergebnisse der Abbildung 17C zeigen, dass $F4/80^+$ MP vor der Infektion bei 11,7 % GFP Expression liegt, die doppelt negative Population bei 9,7%, wohingegen CD103 bei 2,2% liegt und als GFP negativ betrachtet werden kann. Nach der Infektion mit *C. rodentium* erhöht sich der Anteil an $F4/80^+$ GFP^+ MP auf 23,9%, der Wert der doppelt negative Population erhöht sich auf 14,9%, die CD103 positive Population bleibt bei 2,4% und kann demnach wieder als GFP negativ betrachtet werden. Es ist somit eine Verschiebung der GFP positiven Populationen nach der Infektion erkennbar. Dennoch ist der Anteil der $CD11c^+$ $F4/80^+$ GFP^+ Zellen am höchsten, die $CD11c^+$ $F4/80^-$ $CD103^-$ steigen zwar auch an, jedoch ist der Anteil kleiner und es kann sich hierbei um unterschiedliche Zellen handeln die CX_3CR1 exprimieren.
Zusammengenommen kann aus den Ergebnissen der Quantifizierung und Charakterisierung (Abb. 16 und 17) der CX_3CR1^+ Zellen ausgesagt werden, dass

der CX_3CR1 nach der Infektion mit *C. rodentium* hochreguliert wird und dass es sich hierbei um MP handelt, da diese $CD11c^+$, $F4/80^+$ und CX_3CR1^+ exprimieren.

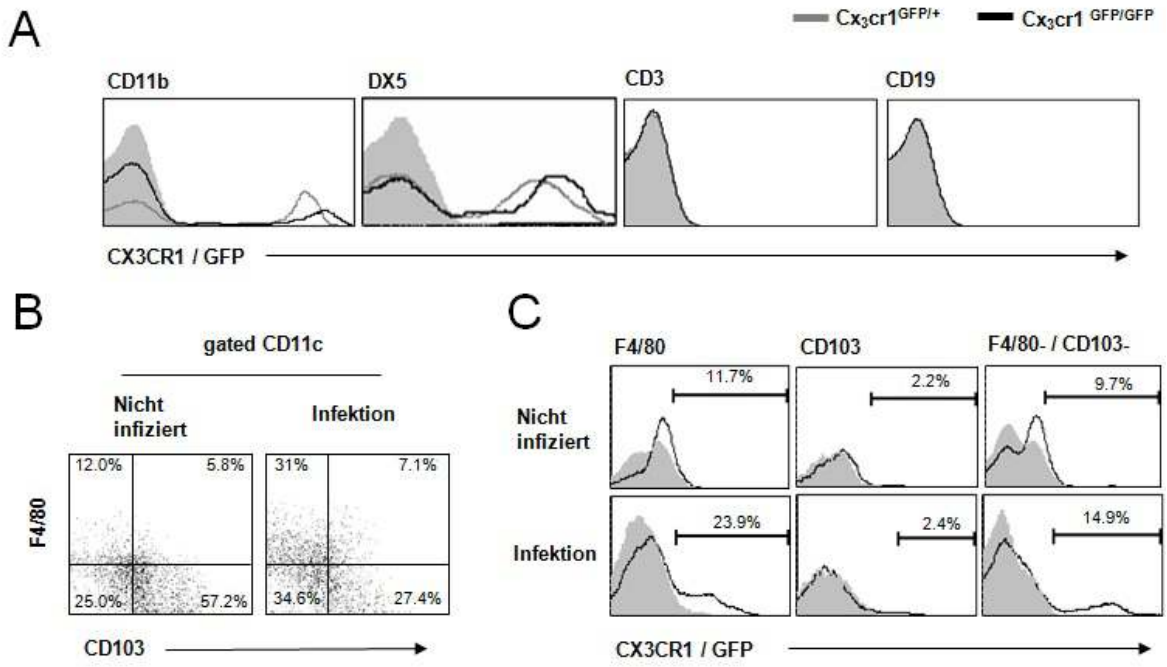


Abbildung 17. CX_3CR1^+ Makrophagen (MP) akkumulieren in der Kolon Lamina Propria (KLP) von *C. rodentium* infizierten CX_3CR1-GFP Mäusen.

A. Das Blut von hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen wurde entnommen, die roten Blutkörperchen wurden mittels Lysepuffer entfernt. Die Lymphozyten wurden dann mit CD11b, DX-5, CD3 und CD19 gefärbt. Die Histogramme wurden auf die entsprechenden Zellpopulationen eingegrenzt. Die mit grau gefüllten Histogramme sind Wildtyp Negativkontrollen. Die offenen Histogramme in grau entsprechen den heterozygote CX_3CR1-GFP Mäuse, die offenen Histogramme in schwarz entsprechen den homozygoten Mäusen. **B.** Dendritische Zellen und Makrophagen wurden aus der KLP von nicht-infizierten und infizierten homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen isoliert und anschließend mit CD11c, F4/80 und CD103 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Dot Blots wurden auf $CD11c^+$ Zellen eingegrenzt. Die Zahlen repräsentieren die gemessenen Prozentanteile. **C.** Die CX_3CR1-GFP Expression wurde analysiert in dem auf $F4/80^+$ $CD103^-$ $CD11c^+$, auf $F4/80^-$ $CD103^-$ $CD11c^+$ und auf $F4/80^-$ $CD103^+$ $CD11c^+$ eingegrenzt wurde und als Dot Blot dargestellt. Die offenen Kurven in schwarz entsprechen den homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen, die gefüllten grauen Kurven entsprechen den Wildtyp Mäusen. [Abkürzungen: CD – "Cluster of differentiation"; CX_3CR1 – Fraktalkinrezeptor; GFP – "Green fluorescent protein"; F4/80 – Makrophagenmarker]

3.3 CX_3CR1^+ Makrophagen ko-lokalisieren mit *C. rodentium*

In den vorherigen Experimenten konnten wir zeigen, dass ein Knockout des CX_3CR1 einen Einfluss auf die Beseitigung von *C. rodentium* nach der Infektion hat. Des Weiteren haben wir ermittelt, dass FKN und MP die CX_3CR1^+ sind nach der Infektion mit dem Bakterium hochreguliert werden.
Eine Frage, die sich nun stellt ist, ob *C. rodentium* mit den CX_3CR1^+ MP ko-lokalisiert und ob das Bakterium phagozytiert wird.

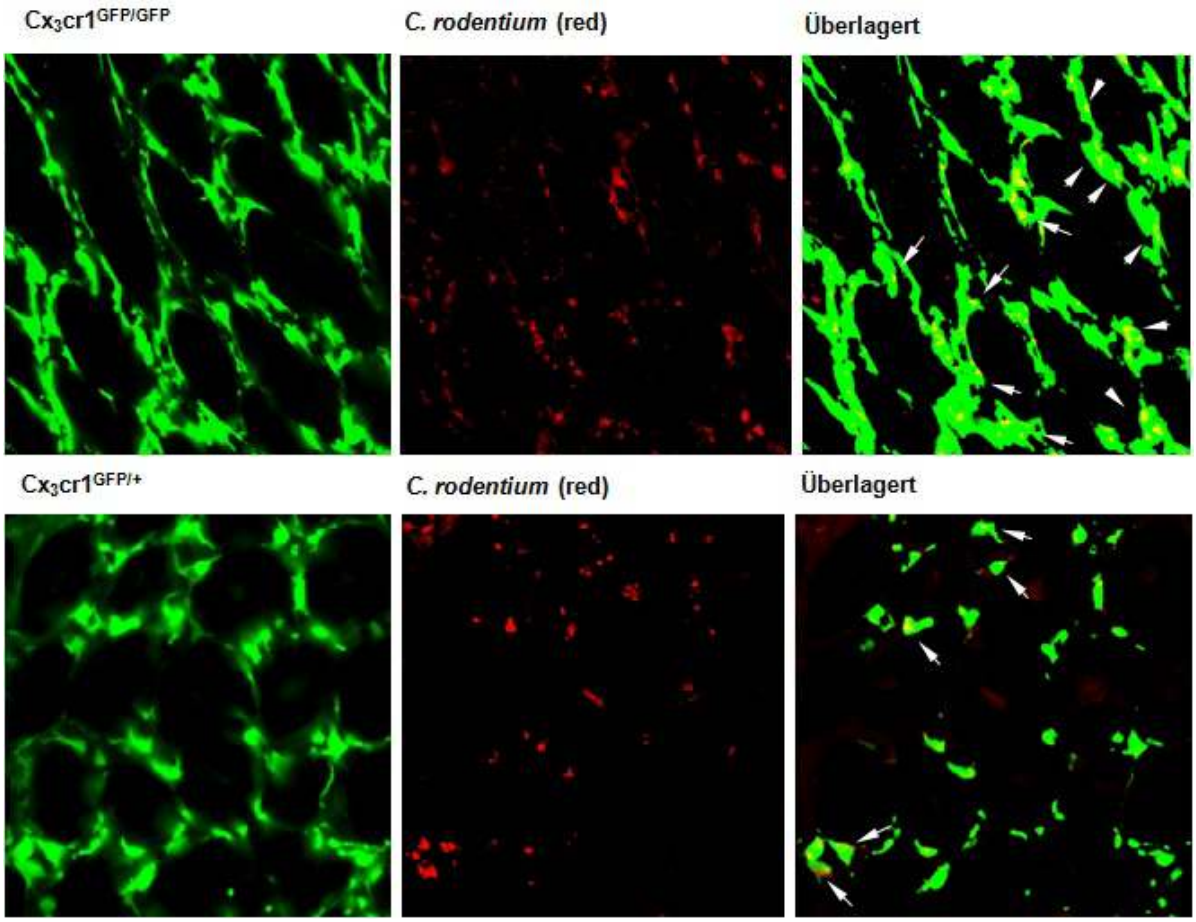


Abbildung 18. *C. rodentium* ist in CX_3CR1^+ Makrophagen lokalisiert.

Hetero- und homozygote CX_3CR1-GFP Mäuse wurden mit der *C. rodentium* Mutante (RF-*C.rodentium*), welche das rot fluoreszierende Protein mRuby exprimiert, infiziert. Zwölf Tage nach der Infektion wurde das lebende Kolongewebe mittels *ex vivo* Imaging untersucht. Zwischen den Darmkrypten sind die GFP^+ Makrophagen (MP) (grün) und die RF- *C. rodentium* (rot) zusehen. Bei der Überlagerung der Kanäle ist eine Ko-Lokalisation von GFP^+ MP und RF-*C. rodentium* zu erkennen. [Abkürzungen: CX_3CR1 – Fraktalkinrezeptor; GFP – "Green fluorescent protein"]

Um diese Fragestellung zu beantworten wurde hetero- und homozygote CX_3CR1-GFP Mäuse mit einem rot fluoreszierenden ICC169 *C. rodentium* infiziert. Hierfür wurde der ICC169 Stamm des *C. rodentium* mit dem Vektor p16S_mRuby stabil transformiert.

Der Vektor enthält das Gen, welches für das Protein mRuby kodiert, dass rot fluoreszierend ist und somit das Bakterium rot färbt. (Der rote *C. rodentium* wird als *RF-C.rodentium* bezeichnet). Die infizierten Mäuse wurden erst zur Peakinfektion untersucht, da zu diesem Zeitpunkt der höchste Anteil an *C. rodentium* zu erwarten ist. Hierfür wird das Mauskolon nach der Entnahme kurz gereinigt und ohne Behandlung auf einen Objektträger fixiert.

Für Abbildung 18 wurde das Kolon von hetero- und homozygoten CX_3CR-GFP Mäusen distal präpariert und dann mittels konfokalem *ex vivo* Imaging aufgenommen.

Die Aufnahmen zeigen, dass die GFP^+ Zellen, die sich zwischen den Krypten des Kolons befinden, sowohl in der hetero- als auch in der homozygoten Maus, in engen Kontakt mit der roten *C. rodentium* Mutante stehen. Durch diese Aufnahmen kann angenommen werden, dass sich das *C. rodentium* auch tatsächlich in den CX_3CR1^+ MP befinden könnte.

Um aber wirklich zu zeigen, dass die Bakterien tatsächlich in den CX_3CR1^+ MP sind, wurde die Duchflusszytometrie (Abb. 19A) gewählt. Zusätzlich wurden die konfokalen Mikroskopieaufnahmen mittels Zeiss ZEM Software quantifiziert (Abb. 19B und C). Hierfür wird der zu analysierende Bereich eingegrenzt, die Software stellt die Bildpunkte in einem Streuungsdiagramm dar. Hier werden die Bildpunkte als rote, grüne und überlagernde Punkte dargestellt, so kann (im Überlappungsbereich) auf den prozentuellen Anteil der eingelagerten Bakterien in den MP rückgeschlossen werden (Abb. 19C).

Die Überlagerung der Bildpunkte ergibt für heterozygote CX_3CR1-GFP Mäuse einen Anteil von 5 % an aufgenommen *C. rodentium*. Die homozygoten Mäuse hingegen zeigen einen Anteil von 2 %. Somit ergibt die Analyse der quantitativen Daten einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$) zwischen den heterozygoten CX_3CR1-GFP Mäuse gegenüber den homozygoten Tieren. Die bessere Aufnahme der Bakterien durch die heterzygoten Mäuse bedeutet, dass das Fehlen des CX_3CR1 die Phagozytose vermindert. Zwar haben wir gezeigt, dass eine Überlagerung der Bildpunkte vorhanden ist und man dadurch annehmen kann,

dass eine Phagozytose stattgefunden hat, jedoch haben wir uns entschieden diese Annahme mittels Durchflusszytomerie zu untermauern.

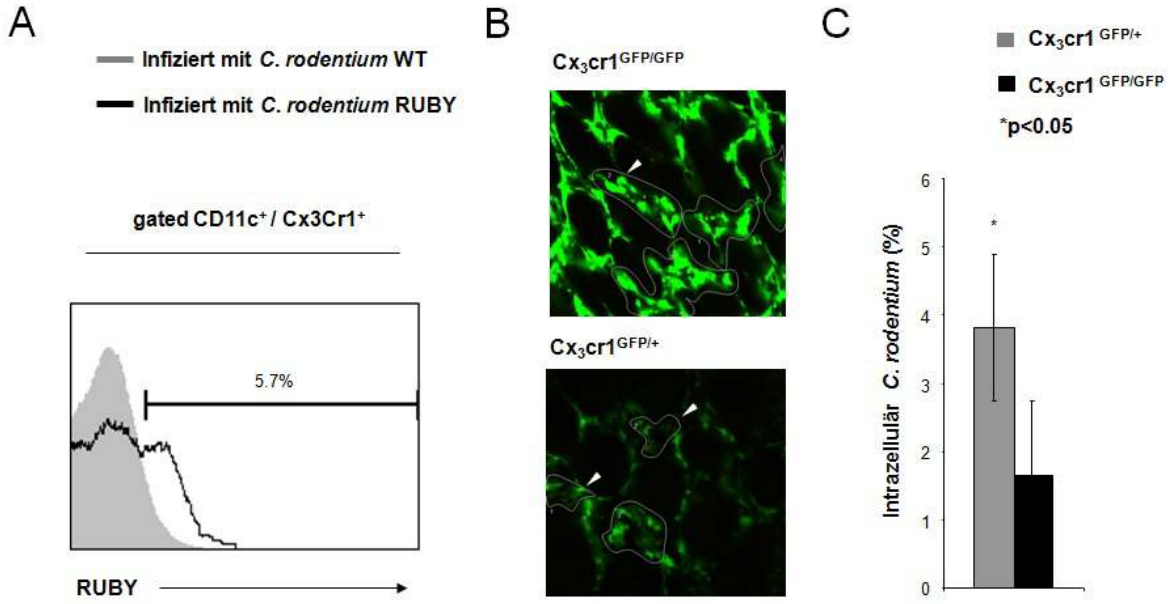


Abbildung 19. *C. rodentium* wird von CX_3CR1^+ Makrophagen (MP) phagozytiert.

A. CX_3CR1^+ $CD11c^+$ Zellen wurden von homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen isoliert, nachdem diese mit der rot fluoreszierenden Mutante mRuby ICC169 *C. rodentium* (RF-*C. rodentium*) infiziert wurden. Die Kolon Lamina Propria (KLP) wurde isoliert, mit CD11c gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Das Histogramm wurde erstellt indem auf $CD11c^+$ und CX_3CR1^+ Zellen begrenzt wurde. Der graue Bereich entspricht CX_3CR1-GFP Mäusen, die mit ICC169 *C. rodentium* infiziert wurden, der weiße Bereich entspricht CX_3CR1-GFP Mäusen, die mit mRuby ICC169 *C. rodentium* infiziert worden sind. **B.** CX_3CR1^+ Zellen wurden als Fläche des zu untersuchenden Bereichs definiert, daraus entstand ein Streuungsdiagramm. Aus diesem wurden die Prozentzahlen an *C. rodentium* ermittelt, die in CX_3CR1^+ MP enthalten sind. **C.** Durchschnittlicher Prozentualer Anteil an *C. rodentium* in MP der jeweiligen Maus entsprechend zugeordnet. p Werte wurden mittels eines nicht- parametrischen Student´s t test errechnet; $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant befunden. [Abkürzungen: CX_3CR1 – Fraktalkinrezeptor; GFP – "Green fluorescent protein"; WT - Wildtyp]

Dafür wurden heterozygote CX_3CR1-GFP Mäuse mit den rot fluoreszierenden *C. rodentium* und dem Wildtyp ICC169 *C. rodentium* infiziert. Die Wildtypform dient als Negativkontrolle.

Nach der Infektion wurden die Lymphozyten isoliert und mit anti-CD11c Antikörper gefärbt. Die Zellen wurden dann im Durchflusszytometer gemessen.

Das Histogramm (Abb. 19A) wurde auf $CD11c^+$ und CX_3CR1^+ Zellen begrenzt. Es ist deutlich eine positive Population von 5,7% an RF-*C.rodentium* ICC169 zu erkennen. Die Zellpopulation, die in der Durchflusszytometrie ausgemacht werden konnte, entspricht auch den Ergebnissen der quantitativen Analyse, die mittels konfokalem *ex vivo* Imaging ermittelt wurden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass $CD11c^+$ CX_3CR1^+ MP das Bakterium phagozytieren. Zusammenfassend kann man zu den Ergebnissen aus Abbildung 18-19 sagen, dass *C. rodentium* nach der Infektion in engem Kontakt mit CX_3CR1^+ $CD11c^+$ MP steht und dass das Bakterium von MP phagozytiert werden. Die Unterschiede in der Ko-Lokalisation von hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen können auf die Phagozytose zurückgeführt werden, da diese bei homogzyoten Mäusen signifikant vermindert ist.

3.4 Interleukin-22 ist in CX_3CR1-GFP Mäusen vermindert

Da in den vorhergehenden Experimenten ein deutlicher Einfluss des CX_3CR1 auf die Beseitigung und die Translokation des Bakteriums nach der Infektion mit *C. rodentium* nachgewiesen werden konnte, stellt sich die Frage, welcher Mechanismus bei der Klärung zugrunde liegt.

Um dies zu beantworten haben wir verschiedene IL und Marker während der Infektion untersucht. Dabei hat sich das IL-22 als besonders interessant herausgestellt. IL-22 ist, wie schon beschrieben, ein wichtiges IL, das vor allem bei der Infektion mit bakteriellen Pathogenen exprimiert wird und zur Freisetzung so genannter antimikrobieller Peptide führt. Diese dienen zur Beseitigung des Angreifers [166].

Wir haben das IL-22 zuerst in einer zeitlichen Abfolge der Infektion auf RNS Ebene untersucht. Abbildung 20E zeigt IL-22 in einen Zeitstrahl vor, während (am Tag vier und acht) und nach der der Infektion mit *C. rodentium* in B6 und in homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen.

Es kann hierbei festgestellt werden, dass IL-22 in B6 Mäusen am vierten und achten Tag nach der Infektion stetig zunimmt. Am Tag acht entsteht ein Peak für dessen Expression, danach sinkt der IL-22 Anteil wieder.

Die IL-22 Expression in CX_3CR1-GFP Mäusen verhält sich ähnlich, jedoch ist der Anteil am Tag vier und acht nach der Infektion mit *C. rodentium* signifikant

geringer. Wir konnten also auch auf RNS Ebene zeigen, dass IL-22 in CX_3CR1 Knockouts schwächer exprimiert wird.

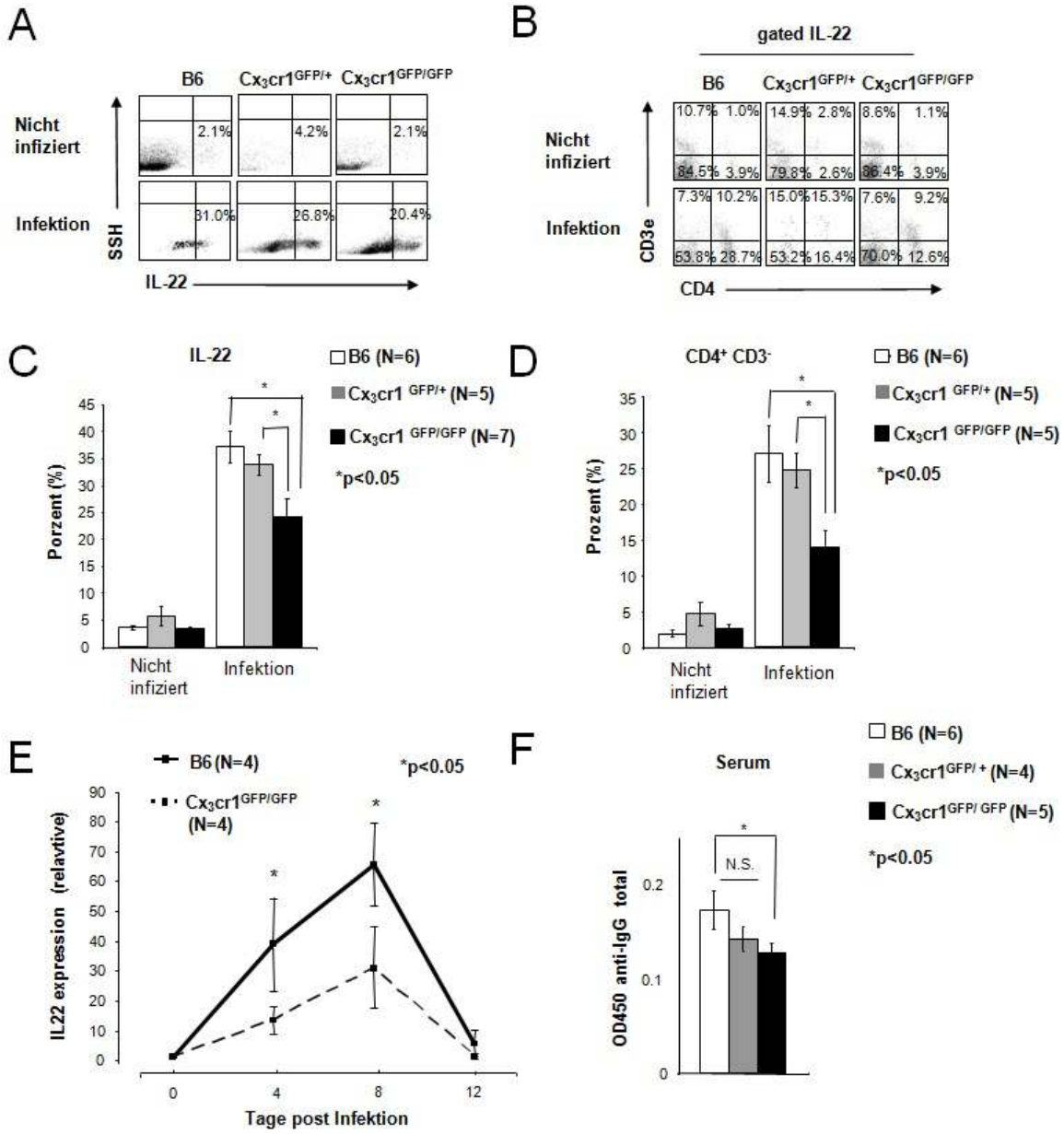


Abbildung 20. Die Interleukin (IL)-22 Expression ist in *C. rodentium* infizierten $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ Mäusen geringer als in B6 Mäusen.

A. Die IL-22 Expression der Zellen, die aus der Kolon Lamina Propria (KLP) von nicht-infizierten und *C. rodentium* infizierten B6 (mit gleichem Alter und Geschlecht), $CX_3CR1^{GFP/+}$ und $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ Mäusen isoliert wurden, wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Zahlen in den Dot Blots entsprechen den erreichten Prozentzahlen. Die Färbung ergibt in den nicht-infizierten Mäusen keinen Unterschied innerhalb der einzelnen Gruppen. In den infizierten Mäusen (Peakinfektion) ist der Anteil an IL-22 in homo- und heterozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen im Vergleich zu B6 gesenkt. **B.** $IL\text{-}22^+$ Zellen wurden aus der KLP von nicht-infizierten und *C.*

rodentium infizierten B6 (mit gleichem Alter und Geschlecht), $CX_3CR1^{GFP/+}$ und $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ Mäusen isoliert und mit anti-CD3ε und anti CD4 Antikörper gefärbt. Die Zahlen geben die erreichen Prozente für CD3ε and CD4 Dot Blots an, nachdem Begrenzen auf IL-22^+ Zellen. Die Färbung ergibt für nicht-infizierte Mäuse keinen Unterschied in den einzelnen Gruppen, während der Peakinfektion ist der Anteil an $CD3^-$ $CD4^+$ Zellen in homo- und heterozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen, im Vergleich zu B6 Mäusen, gesenkt. **C.** Die durchschnittlichen Prozentzahlen der IL-22^+ Zellen, die aus KLP von B6, $CX_3CR1^{GFP/+}$ und $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ Mäusen isoliert wurden. **D.** Es werden die durchschnittlichen Prozentzahlen der $CD3^-$ und $CD4^+$ Zellen dargestellt, die aus KLP von B6, $CX_3CR1^{GFP/+}$ und $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ Mäusen isoliert und auf IL-22^+ Zellen begrenzt wurden. **E.** Gewebe vom proximalen Teil des Kolons von nicht-infizierten und *C. rodentium* infizierten $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ und B6 Mäusen wurde isoliert. Die umgeschriebene cDNS wurde anschließend mittels quantitativer Realtime (qRT)-PCR untersucht. Für die Untersuchung der cDNS wurde SYBR Green und die angegeben Primer verwendet. ß- Actin wurde zur Kontrolle als “housekeeping“ Gen zur Normalisierung der cDNS zwischen den einzelnen Proben verwendet. Die normalisierten ct-Werte von unbehandelten Proben wurden auf 1 definiert. Die Messung ergibt für B6 Mäuse einen Peak von IL-22 am achten Tag nach der Infektion. $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ Mäuse haben ebenfalls ein IL-22 Peak am achten Tag, dieser ist in Vergleich zur B6 Kontrolle jedoch signifikant reduziert. **F.** Serum von Mäusen, die die Infektion mit *C. rodentium* bereits geklärt haben. Im ELISA konnte gezeigt werden, dass im B6 Mäusen signifikant mehr IgG gebildet wird im Vergleich zu den $CX_3CR1^{GFP/GFP}$. N entspricht der Anzahl der Tiere, die pro Gruppe verwendet wurden. p Werte wurden mittels eines nicht- parametrischen Student´s t test errechnet; $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant befunden; N.S. wurde als statistisch nicht signifikant befunden. [Abkürzungen: B6 – C57Bl6 (Wildtyp Maus); CD – “Cluster of differentiation”; CX_3CR1 – Fraktalkinrezeptor; GFP – “Green fluorescent protein“]

IL-22 wurde ebenfalls mittels Durchflusszytometrie in *C. rodentium* infizierten B6, hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen während der Peakinfektion untersucht (Abb. 20 A und C). Wir konnten mit Hilfe der Durchflusszytometrie zeigen, dass B6 Mäuse durchschnittlich 33% IL-22 exprimieren, während $CX_3CR1^{GFP/+}$ 31% und $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ durchschnittlich 22% Expression zeigten. Der Unterschied zwischen den B6 und $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ hat sich als statistisch signifikant herausgestellt, genauso der Vergleich zwischen $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ und $CX_3CR1^{GFP/+}$.

Wir haben im nicht-infizierten Zustand den Anteil an IL-22 untersucht und für B6 Mäuse durchschnittlich 2,5%, für $CX_3CR1^{GFP/+}$ 5% und für $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ Mäuse 2,5% ermittelt. Es konnte somit für nicht-infizierte Mäuse kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Anhand der Ergebnisse aus Abbildung 20A

und C kann ausgesagt werden, dass IL-22 wirklich während der Infektion mit *C. rodentium* hochreguliert wird und dass es keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout im nicht-infizierten Zustand gibt. IL-22 wird demzufolge in CX_3CR1 Knockout Mäusen in geringerem Maße exprimiert als im Wildtyp, was auch die verlangsamte Beseitigung des Bakteriums erklären kann.

IL-22 weißt auf RNS Ebene einen Peak am achten Tag auf. Des Weiteren konnten unterschiedliche IL-22 Level auch während der Peakinfektion (Tag 12) auf Proteinebene, mittels Durchflusszytometrie Analyse der einzelnen Gruppen ermittelt werden.

Es stellt sich die Frage, von welcher Zellpopulation das IL-22 produziert wird. Um das zu klären wurden verschiedene Marker für unterschiedliche Zellpopulationen untersucht. Wir haben für diese Experimente intrazellulär mit einem Antikörper gegen IL-22 gefärbt und dann mit verschiedenen Oberflächenmarkern nach Unterschieden gesucht. In einer Zellpopulation des angeborenen Immunsystems konnte ein Unterschied gefunden werden. Diese Zellen sind $CD3^-$ und $CD4^+$. Abbildung 20B und D zeigt den Anteil an $CD3^-$ und $CD4^+$ Zellen markiert auf $IL\text{-}22^+$ Zellen, in nicht-infizierten und *C. rodentium* infizierten B6, hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen. In nicht-infizierten Mäusen konnte kein Unterschied zwischen B6 (durchschnittlich 2%) und $CX_3CR1^{GFP/+}$ (5%) bzw. $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ (2,5%) ermittelt werden. In infizierten Mäusen ist ein signifikanter Unterschied zwischen B6 (durchschnittlich 27%), hetero- (24%) und homozygoten CX_3CR1-GFP (14%) Mäusen zu erkennen. Da nur in dieser Zellpopulation ein Unterschied während der Peakinfektion erkennbar war, ist davon auszugehen, dass die IL-22 produzierende Zellpopulation $IL\text{-}22^+$ $CD3^-$ und $CD4^+$ ist. Um diese Zellen näher zu beschreiben, wurde zusätzlich zum CD3 und CD4, weitere Marker untersucht.

Das Screening (Abb. 21A) ergab, dass die Zelle, die $IL\text{-}22^+CD3^-$ und $CD4^+$ ist, für RORγt, für CD127 und für CD117 (hoch) positiv ist und dass CD25 schwach exprimiert wird. Die gesuchte Zellpopulation scheint also $IL\text{-}22^+$, $CD4^+$, RORγt $^{hoch+}$, CD127 $^{hoch+}$, CD117 $^{hoch+}$ und CD25 $^{schwach+}$ zu sein. Dies spricht dafür, dass es sich um eine so genannte angeboren lymphoide Zelle handelt, die Teil des angeboren Immunsystems ist [175]. Die Induktion der Expression von IL-22 unterliegt gemäß Literatur dem Einfluss von IL-23 und IL-1β, wobei IL-23 aus

einem Heterodimer zusammengestellt ist, nämlich aus IL-12/IL-23p40 und IL-23p35 [166, 175].

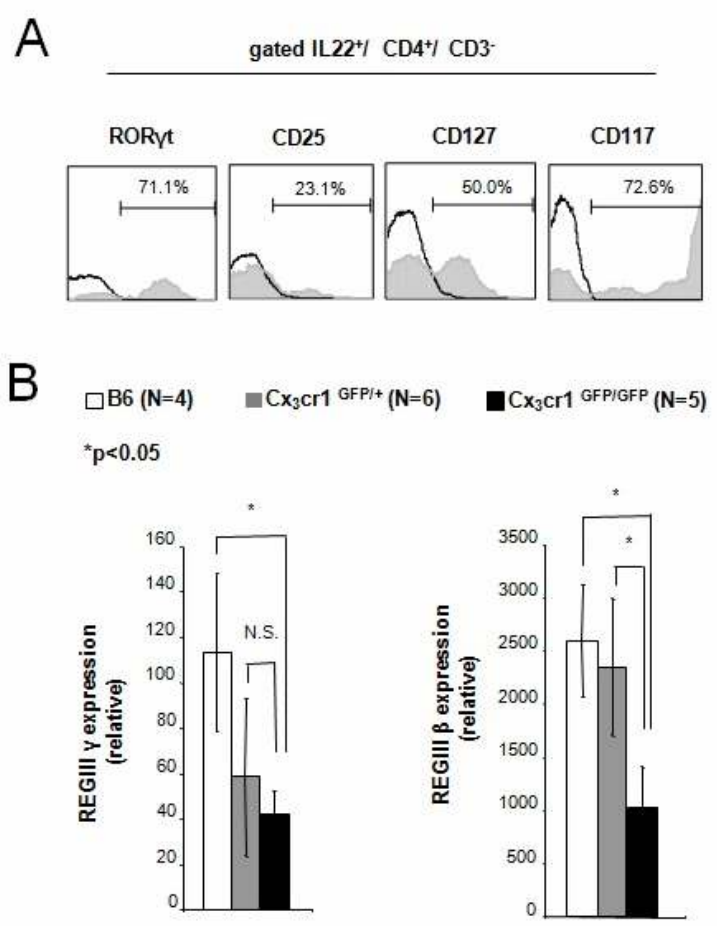


Abbildung 21. IL-22 produzierende Zellen sind CD25$^+$, CD127$^+$, CD117$^+$ und RORγt$^+$ und führen zur Expression von REGIIIγ und REGIIIβ.

A. KLP IL22$^+$ CD3ε$^-$ CD4$^+$ Zellen wurden (intrazellulär) für RORγt gefärbt. Alternativ wurde eine Oberflächenfärbung für CD25, CD127 und CD117 durchgeführt. Die Proben wurden dann mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die offene Kurve entspricht der Negativkontrolle. Die Zahlen in den Histogrammen entsprechen den Prozenten die für die positive Zellpopulation erreicht wurden. **B.** Die gesamt RNS aus den Kolongewebe von nicht-infizierten und *C. rodentium* infizierten B6 (mit gleichem Alter und Geschlecht), $CX_3CR1^{GFP/+}$ und $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ Mäusen wurde isoliert und in cDNA revers transkribiert. Dabei wurde die Expression von REGIIIγ und REGIIIβ mittels qRT-PCR untersucht.

N entspricht der Anzahl der Mäuse, die pro Gruppe verwendet wurden, diese sind in der Abbildung dargestellt. p Werte wurden mittels eines nicht- parametrischen Student´s t test errechnet; $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant befunden. [Abkürzungen: B6 – C57Bl6 (Wildtyp Maus); CD – " Cluster of differentiation"; CX_3CR1 – Fraktalkinrezeptor; IL – Interleukin; GFP – "Green fluorescent protein"]

Da IL-12 das IL-12/IL23p40 mit IL-23 teilt, haben wir auch die zweite Komponente des IL-12, das IL-12p19 analysiert. Wir haben in unseren Versuchen diese Faktoren untersucht (Abb. 22A-C). Die Analyse der cDNS ergab für die IL-1β Primer, dass B6 Mäuse während der Infektion mit *C. rodentium* ein signifikant (9-10 fach) höhere mRNS Expressions-Level aufweisen, als hetero- und homozygote CX_3CR1-GFP Mäuse. Die qRT-PCR für IL-12p40 ergab einen 3-3,6 fach höheren Wert in B6 Mäusen im Vergleich zu hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen und ist somit signifikant. Für die zweiten Komponenten des IL-12 (12p19) und des IL-23 (IL23p35 Ergebnisse nicht gezeigt), ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen B6 und CX_3CR1-GFP Mäusen.

Anhand der Ergebnisse aus Abbildung 22A-C kann ausgesagt werden, dass IL-1β während der Infektion hochreguliert wird und dass, dieses von $CD11^+$ CX_3CR1^+ Zellen exprimiert wird. Für IL-23 kann die regulatorische Signifikanz in diesem Mechanismus nur teilweise angenommen werden, da IL-12/IL-23p40 signifikant erhöht ist, IL-12p19 und IL23p35 (Ergebnisse nicht gezeigt) jedoch nicht.

Ein Effekt von IL-22 ist unter anderem die Hochregulation von antimikrobiellen Peptiden [63, 107]. Es wurden zwei wichtige Vertreter dieser Gruppe untersucht, hierbei handelt es sich um REGIIIβ und REGIIIγ. Für diese Untersuchung wurde die RNS von B6, $CX_3CR1^{GFP/+}$ und $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ Mäusen am 12 Tag nach der Infektion mit *C. rodentium* vom proximalen Kolon isoliert. Die Abbildung 21B zeigt, dass der Anteil an REGIIIγ und REGIIIβ im homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen signifikant geringer ist als in B6 Mäusen. Die heterozygoten CX_3CR1-GFP Mäuse liegen in beiden Experimenten zwischen B6 und homozygoten CX_3CR1-GFP, für REGIIIγ ist der Unterschied zu homozygoten CX_3CR1-GFP gerade nicht mehr signifikant. Jedoch ist der Unterschied für REGIIIβ signifikant. Es scheint also eine Korrelation zwischen IL-22 Expression und dem Anteil an antimikrobiellen Peptiden zu geben.

Wir haben noch einen weiteren Parameter untersucht. Es handelt sich hierbei um das Serum, das ein wesentlicher Faktor bei einer Infektion darstellt. Da nach einer Infektion Antikörper gegen die Mikrobe gebildet werden, die bei einer erneuten Infektion von Gedächtnis B Zellen abgegeben werden und dieses gleich eindämmen, waren wir interessiert daran, ob wir Unterschiede in den Titern erkennen können. Zu diesem Zweck wurden die Seren von B6, hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen untersucht.

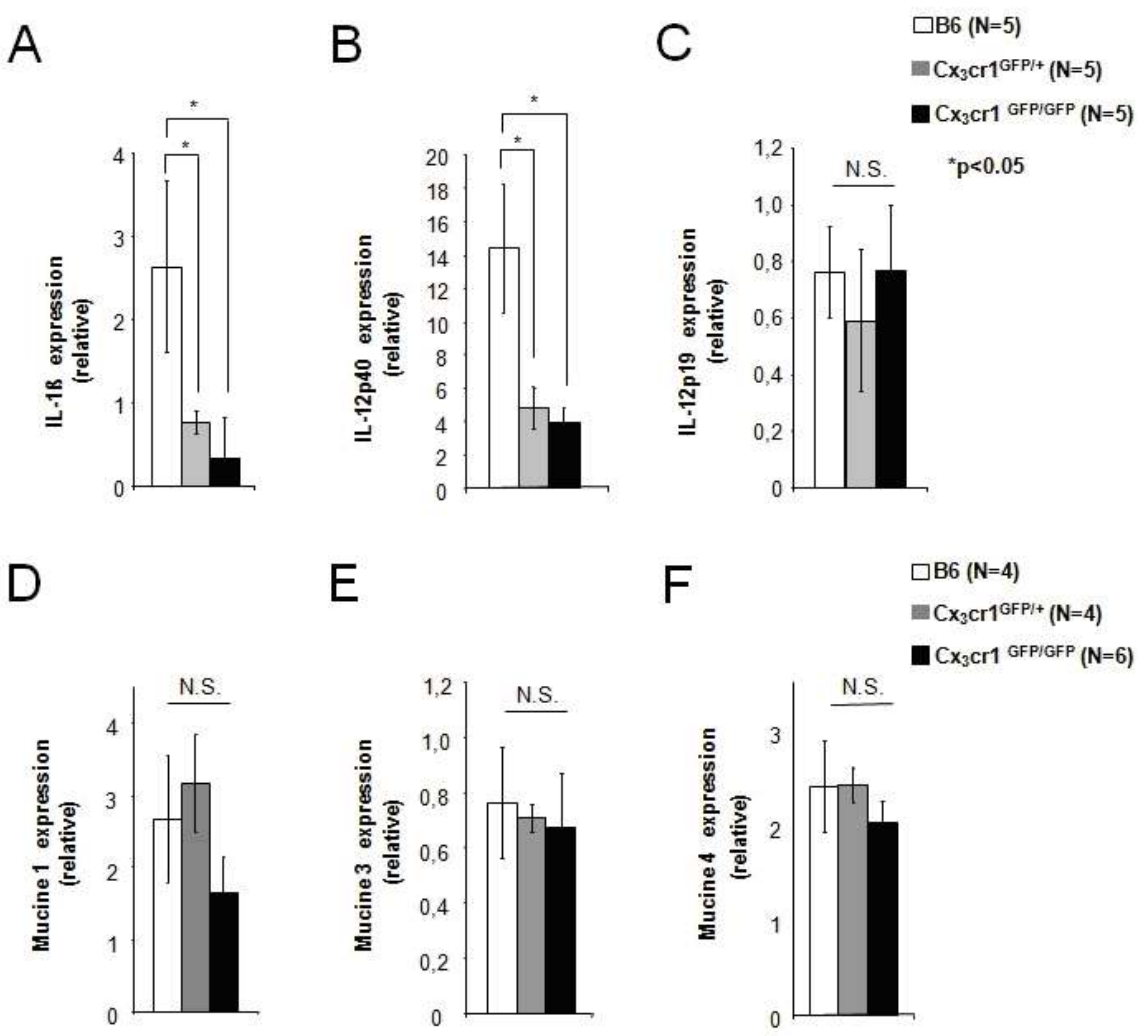


Abbildung 22. Das Fraktalkin (FKN)/ CX_3CL1 induziert die Expression von Interleukin (IL)-1β und IL-12p40 im Kolon von *C. rodentium* infizierten Mäusen.

Das Kolon von nicht-infizierten und *C. rodentium* infizierten (während der Peakinfektion) B6 (alters- und geschlechtlich- abgestimmt), $CX_3CR1^{GFP/+}$ und $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ Mäusen wurde entnommen, die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben, diese wurde anschließend mittels Interleukin (IL)-1 β, IL-12p40, IL-12p19, mucine1, mucine3 und mucine4 Primern und quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) untersucht. N entspricht der Anzahl der Tiere, die pro Gruppe verwendet wurden. p Werte wurden mittels eines nicht- parametrischen Student´s t test errechnet; $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant befunden. N.S. wurde als statistisch nicht signifikant befunden. [Abkürzungen: B6 – C57Bl6 (Wildtyp Maus); CX_3CR1 – Fraktalkinrezeptor; GFP – "Green fluorescent protein"]

Die Seren wurden hierfür auf eine Platte mit fixierten *C. rodentium* aufgetragen. Da das Serum der Mäuse nach der Klärung von *C. rodentium* entnommen wurde, müssen Antikörper gegen dieses zu finden sein. Die Antikörper, die im Serum vorhanden sind binden daher an die Oberfläche des Bakteriums. Die gebundenen

Antikörper werden anschießend mit Peroxidase gekoppelten anti–Maus gesamt IgG inkubiert. Das umgesetzte Substrat wird bei OD_{450} gemessen. Abbildung 20 F zeigt die Ergebnisse der ELISA Messung der Seren.

Nach der Messung konnten wir zeigen, dass es signifikante Unterschiede zwischen B6 und CX_3CR1-GFP Mäusen gibt, dabei haben B6 einen höheren Anteil an Antikörpern gebildet als die CX_3CR1 Knockoutmäuse. Dieses Ergebnis kann jedoch nicht mit unserem Modell erklärt werden, da unser Modell in diesem Fall das adaptive Immunsystem nicht mit einbezieht. Man kann den signifikanten Unterschied dadurch erklären, dass das FKN zusätzlich eine Rolle im adaptiven Immunsystem hat, dies aber nicht im direkten Zusammenhang zur Abwehr im angeborenen Immunsystem steht.

Weitere Faktoren, die untersucht wurden sind „Mucine“, die auf der Darmschleimhaut abgesondert werden und eine Mukusschicht bilden [63]. Diese Schicht gilt als Sterilzone, aber auch als Interaktionszwischenraum von Darmepithelzellen und Darmflora [63]. In unseren Versuchen wurden *mucin1*, *mucin2* und *mucin4* untersucht (Abb. 22C-D). Es ergab sich kein Unterschied im diesen Faktoren, daher kann angenommen werden, dass diese keinen weitreichenden Einfluss in der Infektion mit *C. rodentium* haben.

Die Experimente aus Abbildung 20 und 21 haben gezeigt, dass ein CX_3CR1 Knockout mit einem geringeren Anteil an IL-22^+ und auch an $CD3^-CD4^+$ Zellen, nach einer *C. rodentium* Infektion, verbunden ist. Des Weiteren konnten wir nachweisen, dass in homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen, die REGIIIγ und REGIIIβ Expression verringert ist.

3.5 CX_3CR1-GFP x $RAG^{-/-}$ zeigen erhöhte Mortalität nach der Infektion mit *C. rodentium*

In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass CX_3CR1 einen Einfluss auf die IL-22 und die $CD4^+$ RORγt^+ „innate lymphoid cells“ (ILC) des angeborenen Immunsystems nach der Infektion mit *C. rodentium* aufweist. Um das adaptive Immunsystem bzw. dessen Einfluss auszuschalten und um die direkte Wirkung auf das angeborene Immunsystem zu untersuchen, wurden $RAG^{-/-}$ Mäuse, sowie eine CX_3CR1-GFP x $RAG^{-/-}$ Kreuzung gewählt. RAG

Knockoutmäuse besitzen keine TZR und BZR Rekombination, da die Rag 1 und 2 Enzyme fehlen [2, 93]. Die Konsequenz einer fehlenden TZR bzw. BZR Rekombination ist das Fehlen von T und B Zellen, $RAG^{-/-}$ sind daher stark immunsupprimiert [2, 93].

$RAG^{-/-}$ und CX3CR-GFP x $RAG^{-/-}$ Mäuse wurden für dieses Experiment mit *C. rodentium* infiziert. Auch für diese Versuchsreihe wurde das Gewicht der Tiere überwacht (Abb. 23 A). Die Gewichtskurve zeigt, dass die CX_3CR1-GFP x $RAG^{-/-}$ gekreuzten Mäusen nach Tag 11 stark an Gewicht verlieren. Letztendlich müssen diese Mäusen am Tag 16- 19 nach der Infektion aus den Experiment genommen werden (Abb. 23B). $RAG^{-/-}$ Mäuse hingegen, brauchen 8- 9 Tage länger bis das kritische Gewicht erreicht ist und diese auf Grund dessen aus dem Experiment entfernt werden müssen. Der Unterschied in der Gewichts- und Überlebenskurve wurden für statistisch signifikant befunden. Nachdem die Mäuse fachkundig getötet wurden, wurden das Gewichts- und das Längenverhältnis des Kolons überprüft (Abb. 23C und D). Der errechnete Index aus Gewichts- und Längenverhältnis ergab für die CX_3CR1-GFP x $RAG^{-/-}$ eine dramatische Verkürzung bei gleichzeitiger Gewichtszunahme des Kolons (Index 7,9), was für einen starken Erkrankungsgrad spricht. Vergleicht man den Index der $RAG^{-/-}$ Mäuse mit dem der CX_3CR1-GFP x $RAG^{-/-}$ Mäuse (Index 6,0) ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p<0,05$).

Es war uns möglich zu zeigen, dass CX_3CR1-GFP x $RAG^{-/-}$ Mäuse nach einer Infektion mit *C. rodentium* stärker erkranken und schneller sterben als einfache $RAG^{-/-}$. Somit wird die direkte Verbindung von Infektion zum CX_3CR1 gezeigt und zwar ohne den Einfluss des adaptiven Immunsystems. Um den Mechanismus basierend auf IL-22 und den ILC aus den vorhergehenden Experimenten (Abb. 21 und 22) zu bestätigen, muss die IL-22 Expression während der frühen Infektion untersucht werden. Die Expression von IL-22 wurde auf RNS Ebene mittels qRT-PCR ermittelt (Abb. 24A). Für dieses Experiment wurde Kolongewebe von nicht-infizierten und *C. rodentium* infizierten $RAG^{-/-}$ und $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ x $RAG^{-/-}$ vom proximalen Teil entnommen und für die qRT-PCR entsprechend Protokoll vorbereitet. Die qRT-PCT ergab das $RAG^{-/-}$ Mäuse einen Peak der IL-22 Expression am Tag 4 nach der Infektion aufweisen, am Tag 8 sinkt die IL-22 Expression auf die Hälfte ab. Die IL-22 Expression in $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ x $RAG^{-/-}$

Mäusen steigt im Vergleich zu den RAG$^{-/-}$ Mäusen kaum an und verbleibt fast auf einem Nullwert.

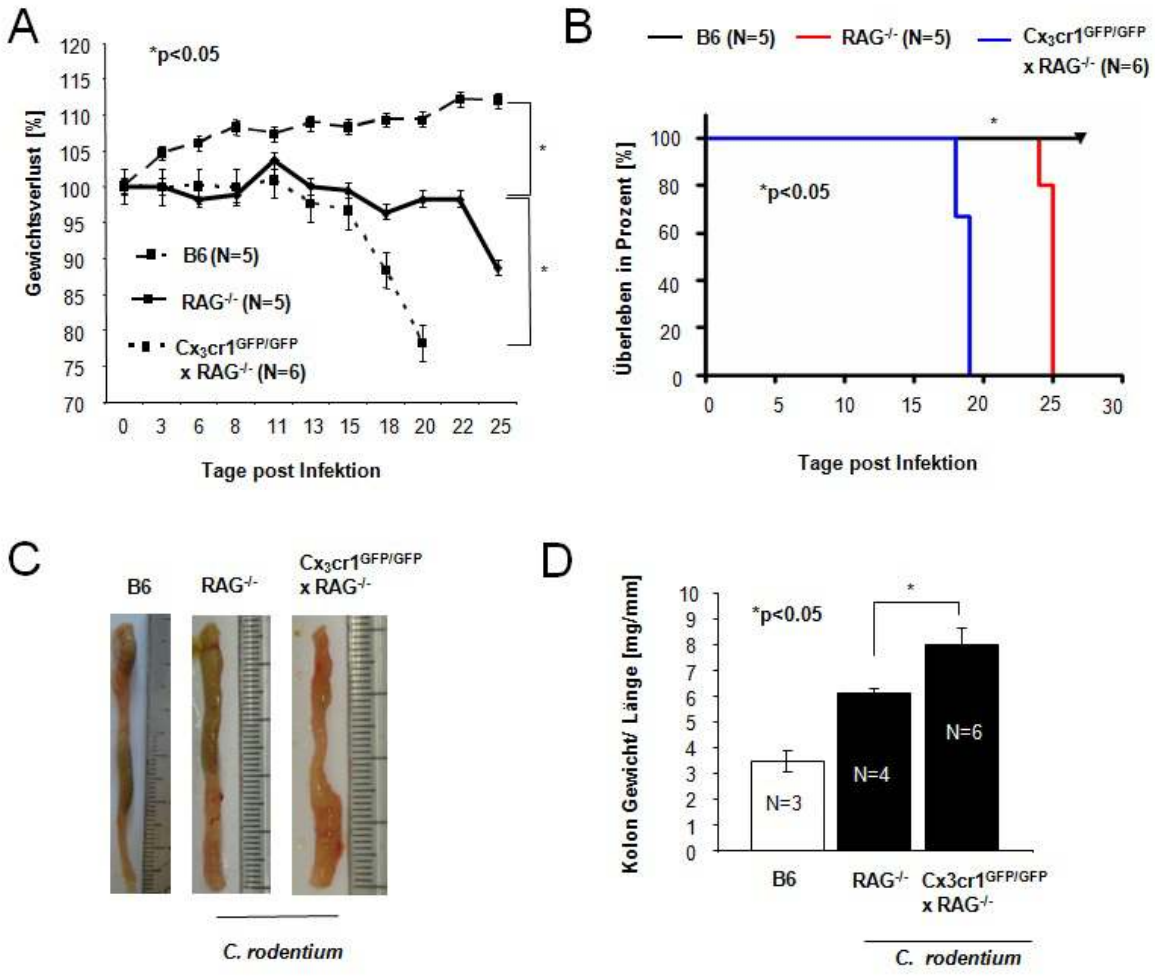


Abbildung 23. CX$_3$CR1 x RAG$^{-/-}$ Mäuse haben während einer *C. rodentium* Infektion eine erhöhte Suszeptibilität in Vergleich zu RAG$^{-/-}$ Mäusen.

A. CX$_3$CR1 $^{GFP/GFP}$ x RAG$^{-/-}$ und RAG$^{-/-}$ Mäuse wurden mit 2x10^9 *C. rodentium* infiziert. Es wird die durchschnittliche Abnahme des Körpergewichts (%) pro Gruppe gezeigt. **B.** Das Überleben von CX$_3$CR1 $^{GFP/GFP}$ x RAG$^{-/-}$ und RAG$^{-/-}$ Mäusen nach der Infektion mit 2x10^9 *C. rodentium* ist dargestellt. **C.** Das Kolon wurde nach Beendigung des Experiments entfernt, abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Kolon pro Gruppe. **D.** Die Länge und das Gewicht des Kolons wurden ermittelt und in der Grafik als Kolon Gewichts-/Längenverhältnis dargestellt. Hierbei fällt auf, dass die CX$_3$CR1 $^{GFP/GFP}$ x RAG$^{-/-}$ Maus ein stark verdicktes und verkürztes Kolon aufweist, das kaum noch Kot enthält. N entspricht der Anzahl der Tiere, die pro Gruppe verwendet wurden. p Werte wurden mittels eines nicht- parametrischen Student´s t test errechnet; $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant befunden. [Abkürzungen: B6 – C57Bl6 (Wildtyp Maus); CX$_3$CR1 – Fraktalkinrezeptor; GFP – "Green fluorescent protein"; RAG – Mäuse ohne Thymus Zellen und "Bone marrow" Zellen]

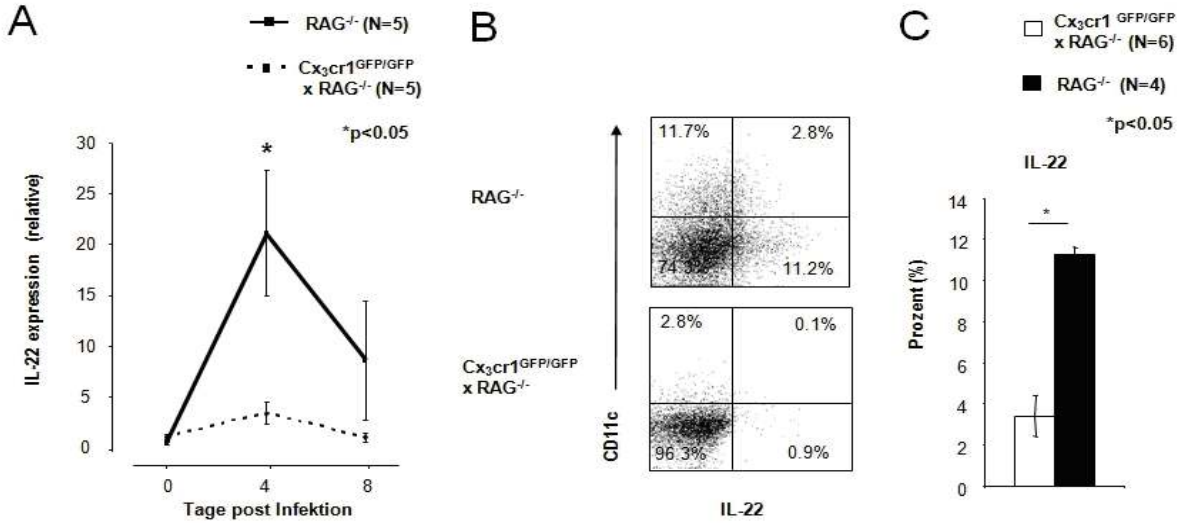


Abbildung 24. Die Interleukin (IL)-22 Expression ist in der quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR), wie auch in der Durchflusszytomerie in CX_3CR1-GFP x $RAG^{-/-}$ Mäusen stark herunterreguliert.

A. Es wurde Gewebe vom proximalen Teil des Kolons von nicht-infizierten und *C. rodentium* infizierten $RAG^{-/-}$ und CX_3CR1-GFP x $RAG^{-/-}$ Mäusen isoliert. Aus diesem Gewebe wurde RNS isoliert, mittels reverser Transkription in cDNS umgeschrieben und anschließend mittels qRT-PCR untersucht. Es wird gezeigt, dass die IL-22 Expression der $RAG^{-/-}$ Mäuse an den Messzeitpunkten höher ist im Vergleich zu CX_3CR1-GFP x $RAG^{-/-}$. Am Tag 4 nach der Infektion ist der Unterschied signifikant. **B.** Die IL-22 Expression der isolierten Kolon Lamina Propria (KLP) Zellen von *C. rodentium* infizierten $RAG^{-/-}$ (mit gleichem Alter und Geschlecht) und CX_3CR1-GFP x $RAG^{-/-}$ Mäusen wurden mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Zahlen zeigen die gemessenen Prozente an erreichten Zellanteilen. Hierbei ist der Anteil an IL-22 und CD11c in CX_3CR1-GFP x $RAG^{-/-}$ Mäusen signifikant herunterreguliert. **C.** Es werden die durchschnittlichen Prozentzahlen der IL-22^{+} Zellen aus der KLP von $RAG^{-/-}$ und CX_3CR1-GFP x $RAG^{-/-}$ gezeigt. Der Unterschied von 7,6 % an positiven Zellen zwischen $RAG^{-/-}$ und CX_3CR1-GFP x $RAG^{-/-}$ ist signifikant.

N entspricht der Anzahl der Tiere, die pro Gruppe verwendet wurden. p Werte wurden mittels eines nicht- parametrischen Student´s t test errechnet; $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant befunden. [Abkürzungen: CD – " Cluster of differentiation"; CX_3CR1 – Fraktalkinrezeptor; GFP – "Green fluorescent protein"; RAG – Mäuse ohne Thymus Zellen und "Bone marrow" Zellen]

Die durchflusszytometrische Untersuchung ergibt ein ähnliches Ergebnis (Abb. 24B und C). Der intrazelluläre Nachweis von IL-22 mittels einer Färbung ergibt, dass bei $RAG^{-/-}$ Mäusen durchschnittlich 11,3% der Zellen gefärbt sind, während bei $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ x $RAG^{-/-}$ Mäusen nur durchschnittlich 3,7 % positiv sind. Die Ergebnisse der qRT-PCR und der Durchflusszytomerie zeigen, dass der IL-22 Anteil in $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ x $RAG^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu $RAG^{-/-}$ Mäusen sowohl

während der frühen Infektion als auch während eines späteren Zeitpunkts reduziert ist.

Die Ergebnisse aus Abbildung 23-24 untermauern somit nicht nur unseren IL-22 Mechanismus, sondern zeigen die direkte Verbindung zwischen CX_3CR1 und dem angeboren Immunsystem in einem RAG Hintergrund.

3.6 $CD11c^+$ CX_3CR1^+ Zellen sind notwendig für die Beseitigung von *C. rodentium*

Wir konnten bisher zeigen, dass die Infektion von *C. rodentium* bei CX_3CR1-GFP Mäusen zu einer verlangsamten Genesung führt. Dies geht mit einer verstärkten Translokation des Bakteriums in verschiedenen Organen einher. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die Phagozytose von *C. rodentium* von CX_3CR1^+ Zellen bewerkstelligt wird und ein IL-22 basierender Mechanismus zugrunde liegt. Da die Immunzellen des Darms einem komplexen Regulations- und Proliferations-mechanismus unterliegen, versuchen wir einen wichtigen Marker in diesem System auszuschalten. Die Komponente bzw. den Marker, den wir entfernen wollen ist das CD11c. Das CD11c wird, wie vorher schon beschrieben, von DZ, aber auch von MP auf der Oberfläche exprimiert [100]. Wir haben schon in den vorherigen Experimenten gezeigt, dass eine Verbindung zwischen CD11c und CX_3CR1 besteht. Dies wurde in Abbildung 17 und 19 verdeutlicht. Wir konnten also zeigen, dass die CX_3CR1^+ MP unter anderem auch CD11c exprimieren. In diesem neuen Experiment wollen wir untersuchen was passiert, wenn diese Zellen entfernt werden.

Mit Hilfe der CD11c.DOG Maus, die auf $CD11c^+$ Zellen den humanen Diphterietoxinrezeptor exprimiert, ist es möglich, diese Zellen spezifisch mittels DT zu entfernen [153]. Um die Verbindung zum CX_3CR1 zu analysieren wurden die CD11c.DOG Maus mit der CX_3CR1-GFP Maus gekreuzt, daraus entstand die CX_3CR1-GFP x CD11c.DOG Maus. Um zu überprüfen welche Zellen durch das DT depletiert werden, wurde ein Vorexperiment durchgeführt, um die Depletion der $CD11c^+$ und der CX_3CR1^+ Zellen in verschieden Organen nachzuweisen. Die CX_3CR1-GFP x CD11c.DOG Mäuse, wurden für dieses Experiment jeden dritten Tag mit 30ng DT/g Körpergewicht behandelt. Abbildung 25 A und B zeigen die

Ergebnisse, die nach der Depletion mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie ermittelt wurden. Für Abbildung 25A wurden unbehandelte und DT behandelte Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Da aus der Literatur bekannt ist, dass CD11c.DOG Mäuse nach einer Dauerbehandlung mit DT eine Toleranz gegen dieses entwickeln können [153], wurde eine Zeitspanne von 14 Tagen Behandlung gewählt, um den Depletionsverlauf zu analysieren. Die Dosis von 30ng DT/g Körpergewicht, wurde zuvor ausgetestet, da darauf geachtet werden muss, dass die toxische Dosis nicht erreicht wird.

Die toxische Grenze ist ab 35ng/g Körpergewicht erreicht, wenn dies täglich appliziert wird [153]. Wir haben verschiedene immunologisch relevante Organe untersucht, die zum entsprechenden Zeitpunkt entnommen wurden. Die isolierten Zellen der entsprechenden Organe wurden dann mit CD11c Antikörper gefärbt und gegen GFP (CX_3CR1) dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass in allen untersuchten Organen die Zellzahlen bis Tag 14 deutlich abnehmen. Es gibt leichte Schwankungen der Prozentzahlen in Milz, MLN und der KLP am Tag 3 und 7. Der letzte Zeitpunkt hingegen zeigt, dass CD11c einfach positive und CD11c CX_3CR1 doppelt positive Zellen sich fast auf einem Nullwert befinden. Um die Depletion der CX_3CR1^+ $CD11c^+$ Zellen auch mikroskopisch zu untermauern, wurden unbehandeltes und DT behandeltes Kolongewebe von entsprechenden Mäusen isoliert.

Die Mikroskopiebilder (Abb. 25B) zeigen, dass der Anteil an GFP positiven Zellen im Kolongewebe, von unbehandelten CX_3CR1-GFP x CD11c.DOG Mäusen sehr hoch ist, nach der Applikation von DT hingegen sind kaum noch grüne Zellen zu erkennen. Diese Ergebnisse haben uns gezeigt, dass wir eine erfolgreiche Depletion der $CD11c^+$ CX_3CR1^+ Zellen durchführen können.

Nun wollten wir wissen, wie sich die Depletion von $CD11c^{+hoch}$ und CX_3CR1^+ Zellen während der Infektion mit *C. rodentium* auswirkt. Hierfür wurden vier unterschiedliche Gruppen mit DT (30ng/g Körpergewicht) behandelt. Die verwendet Gruppen sind B6, CD11c.DOG, hetero- und homozygote CX_3CR1-GFP x CD11c.DOG Mäuse. Die B6 Mäuse dienen als Kontrolle für das DT, um mögliche Einflüsse auf das System ausschießen zu können. Die Mäuse wurden für das Experiment einen Tag vor der Infektion mit DT behandelt, damit die Depletion der $CD11c^+$ Zellen schon vor der Infektion gegeben ist.

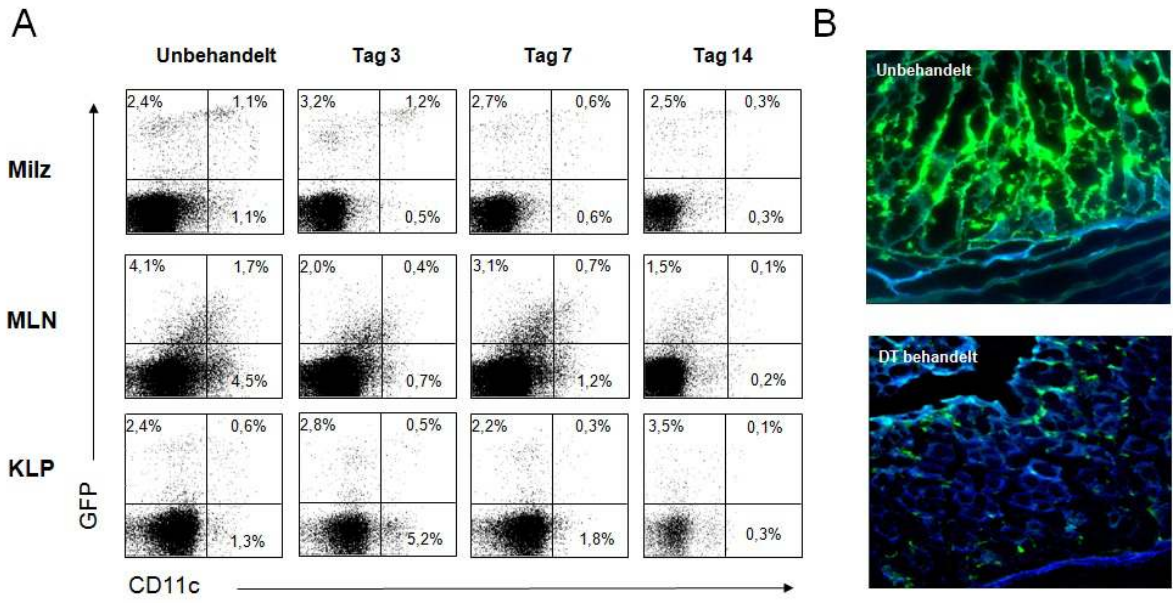


Abbildung 25. CX_3CR1^+ $CD11c^+$ Zellen können mittels Diphterietoxin spezifisch depletiert werden.
A. CX_3CR1-GFP Mäuse wurden mit CD11c.DOG Mäusen gekreuzt, um CX_3CR1-GFP x CD11c.DOG Mäuse zu erhalten. Diese Mäuse wurde während der ersten Woche jeden dritten Tag mit 30ng/g Körpergewicht mit Diphtherietoxin (DT) intraperitoneal behandelt. Die Organe von unbehandelten und mit DT behandelten wurden verglichen. Hierfür wurden die Milz, die mesenterischen Lymphknoten (MLN) und die Kolon Lamina Propria (KLP) isoliert. Die isolierten Organe wurden mit anti CD11c Antikörper gefärbt und dann mittels Durchflusszytometrie zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert. Die Zahlen zeigen die erreichten Prozente an Zellen in den entsprechenden Stellen im Dot Blot. **B.** Das Kolon von unbehandelten und DT behandelten CX_3CR1-GFP x CD11c.DOG Mäusen wurde entfernt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden mittels Kryoschneider in 5-6 µm Schnitte geschnitten. Diese Schnitte wurden durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Jeweils ein repräsentativer (fünf Mäuse pro Gruppe) Schnitt pro Gruppe wird gezeigt. [Abkürzungen: CD – " Cluster of differentiation"; CX_3CR1 – Fraktalkinrezeptor; GFP – "Green fluorescent protein", CD11c.DOG – Mäuse exprimieren den humane DT Rezeptor]

Das DT wurde nach der Infektion mit *C. rodentium* jeden dritten Tag während der ersten Woche verabreicht, da sich diese Zeitpunkte in den Vorversuchen als optimal herausgestellt haben. Abbildung 26A zeigt den Gewichtsverlauf der infizierten Mäuse. Es ist deutlich zu erkennen, dass die CD11c.DOG, hetero- und homozygote CX_3CR1-GFP x CD11c.DOG Mäuse schon ab Tag sieben deutlich an Gewicht verlieren. An Tag 13 nach der Infektion sind die DT behandelten CD11c.DOG Mäuse, die hetero- und homozygote CX_3CR1-GFP x CD11c.DOG

Mäuse deutlich kränker als die unbehandelten CD11c. DOG Mäuse. Dies verdeutlicht der signifikante Unterschied in der Gewichtskurve.

Die Überlebenskurve (Abb. 26B) verdeutlicht, dass die DT behandelten CD11c.DOG, hetero- und homozygote CX_3CR1-GFP x CD11c.DOG Mäuse ca. zwei Wochen nach der Infektion mit *C. rodentium* sterben. Die Translokation des Bakteriums wurde auch untersucht (Abb. 26C). CFU von *C. rodentium* sind in allen DT behandelten Mäusen zu finden, dabei sind die Unterschiede zwischen CD11c. DOG und hetero- bzw. homozygote CX_3CR1-GFPxCD11c. DOG Mäusen in den untersuchten Organen, außer in den MLN, verschwindet gering.

Die DT behandelten B6 Mäuse zeigen auch einen Anstieg der CFU, dieser Unterschied ist aber im Vergleich zu CD11c.DOG, hetero- und homozygote CX_3CR1-GFP x CD11c.DOG sehr gering und statistisch nicht signifikant. B6 Mäuse die mit DT behandelt wurden, scheinen eine leichte Belastung durch das Toxin aufzuweisen, jedoch ist die Translokation im direkten Vergleich nicht sehr hoch. Des Weiteren weisen diese keine starke Reduktion des Gewichts und auch keine starken Krankheitssymptome auf, wie sie bei den anderen DT behandelten Mäusen beobachtet werden. Zu diesen Symptomen gehören gekrümmte Haltung (starke Schmerzen), struppiges Fell, sowie starke Diarrhö.

Die Ergebnisse aus Abbildung 25 zeigen deutlich, dass im Fall einer Depletion der $CD11c^+$ Zellen die Infektion mit *C. rodentium* tödlich verläuft. Die Mäuse sind nicht mehr im Stande das Bakterium zu bekämpfen und sterben nach ca. 14 Tagen. Es war dabei nicht möglich einen Unterschied zwischen *C. rodentium* infizierten nicht-depletierten und depletierten CD11c.DOG, hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP x CD11c. DOG Mäusen festzustellen. Dies verdeutlicht, dass der CX_3CR1 bei der Klärung zwar notwendig ist, das System basiert aber dennoch auf einem CD11c Hintergrund.

Da der bisherige erarbeitete Mechanismus auf IL-22 basiert und dieses von $CD11c^+$ und CX_3CR1^+ MP indirekt über $CD3^-CD4^+$ ILC induziert wird, muss nach einer entsprechenden Depletion der Anteil an $IL\text{-}22^+$ ILC geringer sein. Zu diesem Zweck wurden, wie oben schon beschrieben, hetero- und homozygote CX_3CR1-GFP x CD11c.DOG Mäuse mit DT vorbehandelt und anschließend mit *C. rodentium* infiziert. Die vorbehandelten Mäuse wurden ebenfalls während der ersten Woche, jeden dritten Tag mit DT injiziert und mit unbehandelten CD11c.DOG Mäusen verglichen.

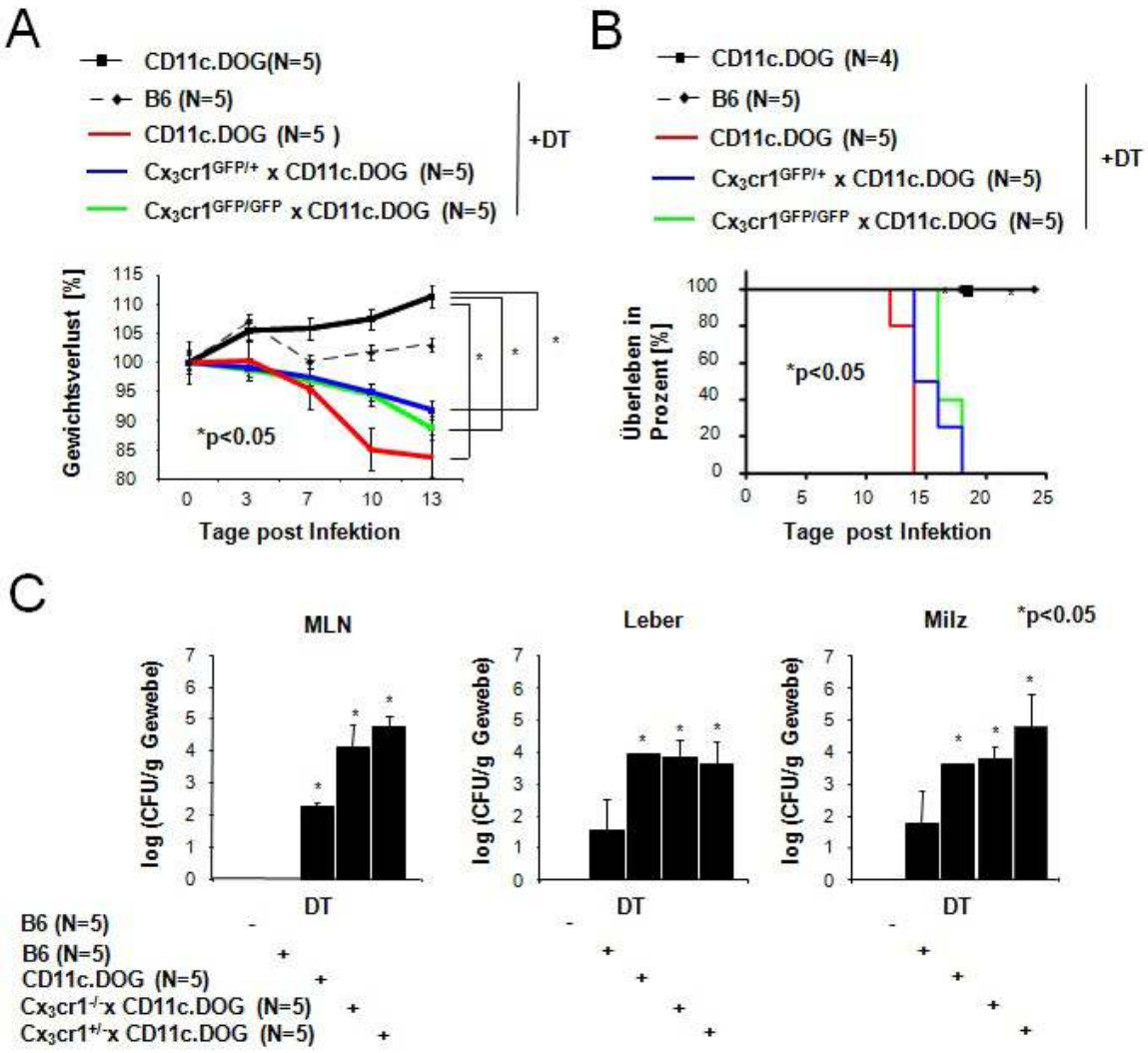


Abbildung 26. Die Depletion von CX_3CR1^+ $CD11c^+$ Makrophagen ergibt eine beschleunigte Infektion mit *C. rodentium*.

A. Unbehandelte CD11c.DOG und Diphtherietoxin (DT) behandelte B6, $CX_3CR1^{GFP/+}$ x CD11.DOG und $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ x CD11c.DOG Mäuse wurden mit $2x10^9$ kolonieformenden Einheiten (CFU) *C. rodentium* infiziert. Es wird der durchschnittliche Gewichtsverlust in Prozent (%) der entsprechenden Gruppe angegeben. **B.** Das Überleben der unbehandelten CD11c.DOG und DT behandelten B6, $CX_3CR1^{GFP/+}$ x CD11.DOG und $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ x CD11c.DOG, die mit $2x10^9$ CFU *C. rodentium* infiziert wurden, wird gezeigt. **C.** Die durchschnittliche CFU der entsprechenden Gruppen, die aus Leber-, Milz- und mesenterischen Lymphknoten (MLN) Homogenat errechnet wurden, werden gezeigt. N entspricht der Anzahl der Tiere, die pro Gruppe verwendet wurden. p Werte wurden mittels eines nicht- parametrischen Student´s t test errechnet; $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant befunden. [Abkürzungen: CD – " Cluster of differentiation"; CX_3CR1 – Fraktalkinrezeptor; GFP – "Green fluorescent protein", CD11c.DOG – Mäuse exprimieren den humane DT Rezeptor]

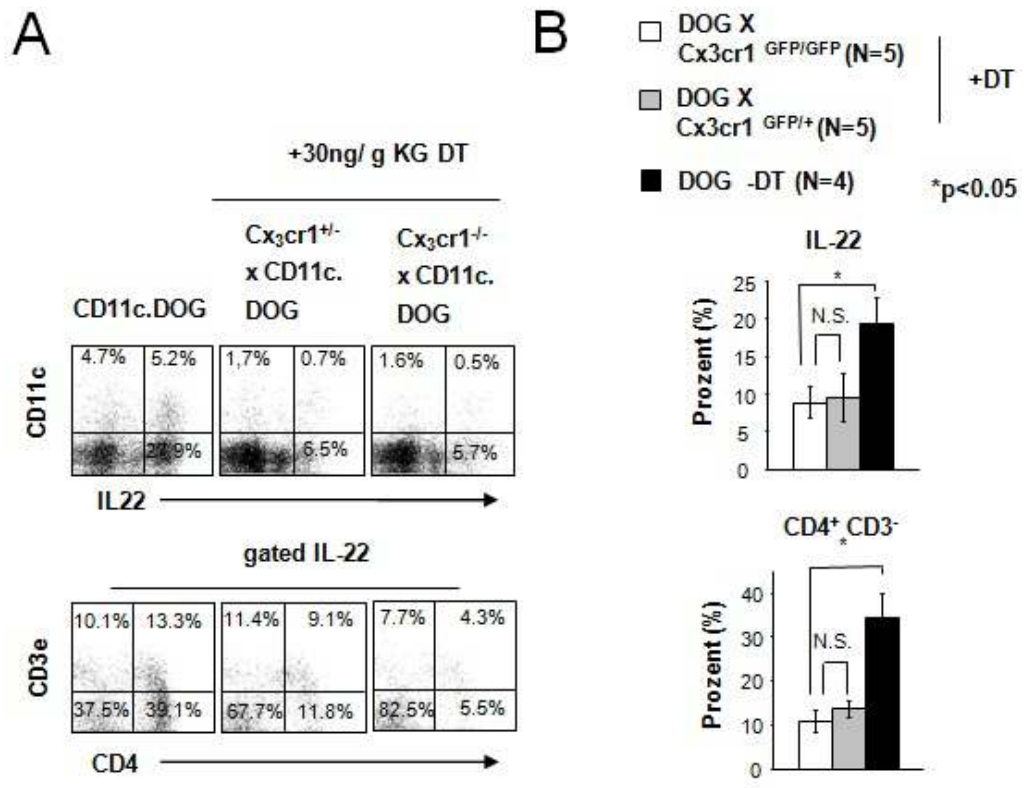


Abbildung 27. Interleukin (IL)-22 ist nach der Infektion mit *C. rodentium* in Diphtherietoxin (DT) behandelten Mäusen herunterreguliert.

A. Am Tag 18 nach der Infektion mit *C. rodentium* wurden die Kolon Lamina Propria (KLP) Zellen von unbehandelten CD11c.DOG und DT behandelten $CX_3CR1^{GFP/+}$ x CD11.DOG und $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ x CD11c.DOG Mäusen isoliert, mit IL-22 intrazellulär gefärbt und anschießend mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die angegeben Zahlen entsprechen den erreichten Prozenten, der gemessenen Zellen im Dot Blot. $IL\text{-}22^+$ Zellen der KLP von unbehandelten CD11c.DOG und DT behandelten $CX_3CR1^{GFP/+}$ x CD11.DOG und $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ x CD11c.DOG Mäusen wurden am Tag 18 isoliert, mit anti CD3 und CD4 gefärbt und mittels Durchflusszytomterie gemessen. Die angegeben Zahlen entsprechen den gemessenen Prozentzahlen für $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD4^+$ and $CD3^-$ $CD4^-$ innerhalb der $IL\text{-}22^+$ Population, die erreicht worden sind. Es werden die durchschnittlichen Prozentzahlen der $IL\text{-}22^+$ Zellen, die aus KLP von unbehandelten CD11c.DOG und DT behandelte $CX_3CR1^{GFP/+}$ x CD11.DOG und $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ x CD11c.DOG Mäusen gezeigt. **B.** Es werden die durchschnittlichen Prozentzahlen der $CD3^-$ und $CD4^+$ Zellen, die aus KLP von unbehandelten CD11c.DOG und DT behandelte $CX_3CR1^{GFP/+}$ x CD11.DOG und $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ x CD11c.DOG Mäusen gezeigt, welche auf $IL\text{-}22^+$ Zellen begrenzt worden sind.
N entspricht der Anzahl der Tiere, die pro Gruppe verwendet wurden. p Werte wurden mittels eines nicht- parametrischen Student´s t test errechnet; $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant befunden. N.S. wurde als statistisch nicht signifikant befunden. [Abkürzungen: CD – " Cluster of differentiation"; CX_3CR1 – Fraktalkinrezeptor; GFP – "Green fluorescent protein", CD11c.DOG – Mäuse exprimieren den humane DT Rezeptor]

Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse. Der Anteil an IL-22 und ILC der nach der Depletion und entsprechender Infektion gemessen wurde, wird hier abgebildet.

Die KLP Zellen wurden hierfür am Tag 10 nach der Infektion isoliert. Hierbei zeigen die unbehandelten CD11c.DOG einen durchschnittlichen Anteil an IL-22 von 19%, während DT behandelte hetero- (9%) und homozygote (9%) CX_3CR1-GFP x CD11c. DOG Mäuse einen Wert aufweisen, der auf die Hälfte reduziert ist.

Der prozentuale Anteil an $CD3^-CD4^+$ ILC, der für die Kontrollen erreicht wurde beträgt 32%, für DT behandelte heterozyote CX_3CR1-GFPxCD11c.DOG Mäuse 12% und für homozygote CX_3CR1-GFP x CD11c.DOG Mäuse 11%. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Anteil an $IL\text{-}22^+$ und an ($CD3^-$ $CD4^+$) ILC, nach der Behandlung mit DT im Vergleich zu den Kontrollen signifikant reduziert ist.

Aus den Ergebnissen (Abb. 25-27) kann somit ausgesagt werden, dass nach einer erfolgreichen Depletion der $CD11c^+$ Zellen das Überleben der Mäuse vermindert ist, dass eine starke Translokation von *C. rodentium* in den Organen stattfindet und die IL-22 Expression reduziert ist. Dabei scheint aber kein Unterschied zwischen DT behandelten CD11c.DOG und hetero- und homozygoten CX_3CR1-GFP x CD11c.DOG Mäusen, bezogen auf das Überleben oder der Translokation des Bakteriums, nachweisbar zu sein. Dies zeigt, dass CX_3CR1 während der *C. rodentium* Infektion nur im CD11c Kontext eine Rolle spielt.

4. Diskussion

4.1 *C. rodentium* führt zur Akkumulation der CX_3CR1 Makrophagen

MP und DZ, welche die KLP besiedeln, werden durch ihre Marker charakterisiert. So gibt es $CD103^+$, CX_3CR1^+ und doppelt negative Lymphozyten, wobei die CX_3CR1 positive Zellen Charakteristika von MP und DZ aufweisen. Wir können in unserem Infektionsmodell klar zeigen, dass es MP sind, die nach der Infektion mit *C. rodentium* hochreguliert werden, da das F4/80 exprimiert wird und dieser Marker ausschließlich auf gereiften MP [85, 113, 124, 149, 150, 178] zu finden ist (Abb. 17 B,C). Derzeit gilt zwar, dass KLP MP in gesunden Mäusen CD11c nur niedrig exprimieren [124]. Wir haben in unseren Versuchen einen Anstieg dieser KLP MP, die CD11c hoch positiv sind, in Verbindung mit F4/80 und CX_3CR1 beobachtet. Allerdings untersuchen wir ein Infektionsmodel. Somit betrachten wir in unseren Experimenten andere Faktoren, welche speziell eine Hochregulation der MP zufolge haben.

Wir haben in den ersten Exprimenten gezeigt, welche Folgen der reine CX_3CR1 Knockout bei einer *C. rodentium* Infektion haben kann. Es wurde schon gezeigt, dass der CX_3CR1 einen Einfluss bei den Infektionen mit unterschiedlichen Pathogenen hat. So ist bei einer Infektion von CX_3CR1 Knockout Mäusen mit *Salmonella typhimurium*, eine hohe Mortalität der Tiere festgestellt worden [97, 99]. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine Infektion mit *C. rodentium* in Mäusen zu einer Erhöhung von verschiedenen CXC Chemokinen und CXCR Chemokinrezeptoren führt [143]. Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass ein Knockout des CXCR2 und CXCR3 zu einer verschlechterten Klärung des Bakteriums führt [143].

Der Einfluss des CX_3CR1 in einem Infektionsmodel mit *C. rodentium* wurde bisher nicht gezeigt.

Im ersten Teil der Experimente ging es darum herauszufinden, welchen Einfluss die Bakterien auf die CX_3CR1 homo- und heterozygoten Knockout Mäuse im Vergleich zu unserer B6 Kontrolle haben. So konnten wir feststellen, dass CX_3CR1

Knockout Mäuse einen längeren Zeitraum benötigen, um das Bakterium zu klären (Abb. 12).

Des Weiteren zeigen die Mäuse einen verstärkten Erkrankungsgrad, bezogen auf die Darmhypoplasie (Abb.13), sowie eine verstärkte Translokation (Abb. 14) des Bakteriums in der Leber, in der Milz sowie in den MLN, wobei dies bei der B6 Maus nicht zu beobachteten war.

Darmbakterien wie *C. rodentium* und *EPEC* (aber auch andere Pathogene) können das Darmepithel zerstören [10, 24, 91]. *C. rodentium* erfährt aber normalerweise keine Translokation über das Darmepithel hinaus [77, 78, 136, 138]. Im Gegensatz zu *Salmonellen,* welches mittels Virulenzfaktoren durchaus das Epithel durchdringen kann, um das Immunsystem gezielt zu überlisten [42, 89, 119, 128, 151]. *C. rodentium* besiedelt lediglich das Darmepithel und setzt von dort aus die Virulenzfakoren frei, ohne das Epithel zu durchdringen [136, 138].

Der Einfluss des CX_3CR1 wurde mit den oben beschriebenen Experimenten verdeutlicht. Es scheint, als ob die gesamte Immunantwort in den CX_3CR1 Knockout Mäusen verzögert ist und auch die Barrierefunktion, bezogen auf die Translokation, scheint gestört zu sein.

CX_3CR1 charakterisiert eine Population von MP im Darm, welche in der KLP einen Abwehrnetzwerk dienen. Sie sind dabei nicht nur auf I) Phagozytose und Antigenpräsentation beschränkt [104, 105], sondern haben auch einen Effekt auf II) die Ausschüttung von Zytokinen [2, 104], welche der Abwehr dienen. Die Herunterregulation von CX_3CR1 würde erklären, warum eine Störung der bakteriellen Abwehr bei den CX_3CR1 Knockout Mäusen vorliegt.

Es muss natürlich ebenfalls herausgefunden werden, welche Faktoren und Zellen an dem Klärungsprozess des *C. rodentium* beteiligt sind. So muss in erster Linie gezeigt werden, dass der Rezeptor hochreguliert wird. Zudem muss die Zelle, welche das CX_3CR1 exprimiert, definiert werden. Diese relevanten Zellen, die nach der Infektion hochreguliert wurden, konnten mittels Durchflusszytometrie definiert werden.

Abbildung 16 zeigt, den Anstieg des CX_3CR1 während der Infektion. Dies wurde indirekt durch den Anstieg an GFP gezeigt, welches den CX_3CR1 in der Knockout Maus ersetzt. Dies ist an den Daten der Durchflusszytometrie und in der *ex vivo* Kinetik deutlich erkennbar. Wir konnten in den nachfolgenden Experimenten auch die GFP positive Zellen definieren. So sind diese Zellen I) CD11c positiv und II)

F4/80 positiv (Abb. 17). Sie proliferieren verstärkt nach der Infektion mit *C. rodentium* und die prozentuellen Werte des GFP dieser Zellen ($CD11c^+$ und $F4/80^+$) steigen von 11,7% auf 27,7%, daher sind diese Zellen als MP einzuordnen. Durch die CD11c.DOG Maus konnten wir auch demonstrieren, dass das CX_3CR1 tatsächlich in einen CD11c Kontext gebraucht wird. Die Infektion mit *C. rodentium* in einer CD11c depletierten CD11c.DOG Maus führt zum Tod dieser Mäuse. Mittels der Kreuzung aus CX_3CR1-GFP und CD11c.DOG Maus konnten wird zeigen, dass es nach der Depletion von CD11c und CX_3CR1 kein Unterschied beim Überleben nach einer Infektion mit dem Bakterium, zwischen CD11c.DOG und CX_3CR1 x CD11c.DOG Maus (homo- und heterozygoten), gibt. Demzufolge ist CX_3CR1 bei einer Infektion mit *C. rodentium* wichtig, jedoch in einem CD11c Kontext.

Zusätzlich zum Einfluss des CX_3CR1 können wir zeigen, dass der Rezeptor an sich während der Infektion mit *C. rodentium* hochreguliert wird. Des Weiteren sind wir in der Lage, die Zellen (welche während der Infektion entscheidend sind) aufgrund ihres Markerprofils als MP zu charakterisieren und mittels CD11c Depletion den Bezug auf KLP MP herzustellen.

4.2 CX_3CR1 Makrophagen phagozytieren *C. rodentium*

Dass *C. rodentium* die KLP besiedelt und hierbei zur Hyperplasie führt, ist durchaus bekannt [91, 165]. Wie der genaue Mechanismus bei diesem Bakterium abläuft, ist noch nicht vollständig geklärt.

Um eine klare Verbindung von Pathogen und CX_3CR1 MP herstellen zu können, wurde der RF-*C. rodentium* Stamm verwendet.

Bei diesem Experiment war es wichtig zu zeigen, dass die CX_3CR1 MP Kontakt zum *C. rodentium* haben.

Wie oben (Abb.18) im *ex vivo* Imaging gezeigt wird, ist deutlich zu erkennen, dass der RF-*C. rodentium* mit den grünen Zellen überlagert.

Wir könnten auch mittels Durchflusszytometrie (Abb. 19 A) eindeutig zeigen, dass CX_3CR1^+ $CD11c^+$ Zellen nicht nur in engem Kontakt stehen, sondern diese scheinbar auch, das Bakterium aufnehmen können. Da CX_3CR1 Zellen in unserem Modell MP sind, müssen diese dazu in der Lage sein *C. rodentium* zu phagozytieren. Da wir für unsere Experimente homo- und heterozyote Mäuse

verwendet haben, konnten wir den Phagozytose-Prozess beider Mäuse mittels *ex vivo* Imaging quantifizieren und analysieren (Abb. 19 B und C). Dabei konnten wir feststellen, dass der Phagozytose-Prozess bei homozygoten Mäusen verschlechtert ist.

Dieses Ergebnis stimmt somit mit bereits bekannten Arbeiten überein, in denen CX_3CR1 Knockout Mäuse eine verschlechtere Phagozytose aufweisen. Dies wurde schon von Medina-Contreras et al. [22, 85] gezeigt.

Wir könnten während einer Infektionskinetik ebenfalls zeigen, dass das FKN (Abb.15) sowohl in B6 Kontrollen und homo- und heterozygoten CX_3CR1 Mäusen gleichermaßen hochreguliert wird. Der Ligand kann somit als Faktor für die verschlechterte Phagozytose ausgeschlossen werden. Demzufolge ist der Knockout im CX_3CR1 für diesen Effekt verantwortlich.

Die CX_3CR1 MP kommen also in engen Kontakt mit dem *C. rodentium* während der Infektion. Diese MP scheinen auch das Bakterium zu phagozytieren, wobei ein Knockout des CX_3CR1 eine verschlechterte Aufnahme zur Folge hat.

4.3 Innate lymphoid cells 22 werden durch CX_3CR1 Makrophagen induziert

Um den genauen Mechanismus während der *C. rodentium* Infektion ermitteln zu können wurden verschiedenen IL, welche bei einer Infektion mit *C. rodentium* üblich sind, untersucht. Unter anderem wurden IL-17, INFγ und IL-12 analysiert, wobei hier die Unterschiede nicht signifikant ausgefallen sind. Ein weiteres IL, welches untersucht wurde, ist das IL-22.

Zheng et al. [180] zeigte bereits, dass IL-22 vor allem während der frühen Abwehr bei einer *C. rodentium* Infektion wichtig ist. Dies wurde auch in unserem Infektionsmodell gezeigt (Abb.20 E), so haben CX_3CR1 homozygote Knockout Mäuse signifikant weniger IL-22 im Vergleich zu der B6 Kontrolle. Der Peak der IL-22 Expression liegt in unseren Versuchen bei Tag 8 nach der Infektion und somit wie bei Zheng et al. [180] während der frühen Phase der Infektion.

Da IL-22, wie oben schon beschrieben, ein wichtiger Regulator für die Ausschüttung von antimikrobiellen Peptiden in Darm ist [38, 46, 126, 156, 157,

180], haben diese Ergebnisse einen weiteren Teil zur Identifikation des Mechanismus beigetragen.

Wir haben auch ermittelten können, dass zwischen CX_3CR1 homo-, heterozygote Knockout Mäusen und B6 Mäusen während der Peakinfektion Unterschiede in der IL-22 Expression vorhanden sind (Abb. 20 A, C). Wobei die Werte der heterozygoten CX_3CR1 Knockout Mäuse zwischen den der homozygoten CX_3CR1 Knockout Mäuse und B6 Mäuse liegen.

Auch nach der Depletion von CD11c konnten wird zeigen, dass der Anteil an IL-22 im Vergleich zu unbehandelten Mäusen signifikant gesenkt ist (Abb. 24 A, B, C). Gleichzeitig ist der IL-22 Anteil in CX_3CR1 x RAG Mäusen nach der Infektion mit *C. rodentium* verschwindend gering (Abb. 27 A, B).

Wir konnten so zeigen, dass in den reinen CX_3CR1 Knockout Mäusen, aber auch in der Kreuzung von CX_3CR1 Mäusen mit RAG Mäusen, sowie nach einer Depletion von CD11c in CD11c.DOG Mäusen, das IL-22 deutlich gesenkt ist.

Die bisherigen Versuche belegen somit, dass IL-22 in der CX_3CR1 Knockout Maus deutlich herunterreguliert ist.

Der nächste Schritt ist demzufolge die IL-22 produzierenden Zellen zu definieren.

Es ist bereits bekannt, dass IL-22 von T Zellen und von DZ der KLP exprimiert werden kann [70, 73, 87, 164, 168, 173, 180]. Dies hat sich in unseren Versuchen nicht bestätigt. Die $CD11c^+$ $CX3CR1^+$ Zellen konnten nicht als IL-22 produzierend festgelegt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Da von uns sämtliche IL-22 produzierenden Zellen untersucht wurden, ergab sich der Unterschied in den $CD4^+$ $CD3^-$ Zellen, die $IL\text{-}22^+$ sind. Diese Zellen werden während der Infektion in B6 und in homo- und heterozygoten CX_3CR1 Knockout Mäusen untersucht (Abb. 20 C, D). Während der Infektion ist der Anteil an $CD4^+$ $CD3^-$ $IL22^+$ in der homozygoten CX_3CR1 Knockout Maus signifikant gesenkt. Dies konnte auch nach der Depletion in der CD11c.DOG Maus (Abb. 27) und auch in der CX_3CR1 x RAG Maus (Abb. 24) beobachtet werden.

Für die spezifische Charakterisierung dieser Zellen, wurden verschiedene Marker verwendet, wobei wir die $CD4^+$ $CD3^-$ Zelle als $ROR\gamma t^+$, $CD127^+$, $CD25^{niedrig+}$ und $CD117^+$ einordnen konnten. Gemäß dieser Marker-Konstellation kann diese Zelle als „Innate Lymphoid Cells“ (ILC) bezeichnet werden, welche IL-22 produziert [18, 129, 166]. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von anderen Gruppen überein, wobei hier die ILC, welche das IL-22 produzieren, als ILC22 bezeichnet

werden [107, 117, 132, 155, 166, 167]. Aus der Literatur ist bekannt, dass ILC22 in der mukosalen Immunantwort besonders wichtig ist [180]. Wir identifizieren die ILC22 als die IL-22 Produzenten, aufgrund der signifikanten Unterschiede in der ILC22 Population, welche sich zwischen B6 Kontrollen und homozygote CX_3CR1-GFP Mäusen ergeben haben.

Es stellt sich nun die Fragen, wie die CX_3CR1 MP einen Einfluss auf die ILC22 haben. Gemäß der Literatur werden ILC22 Zellen durch IL-1β und IL-23 induziert [107, 132, 166].

Diese IL wurden entsprechend (Abb. 22 A-C) untersucht. Die Unterschiede zwischen den B6 und den heterozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen ergaben sich im IL-1β und im IL-12/IL23p40, wobei IL-12/IL-23p40 von IL-12 und IL-23 gemeinsam genutzt wird [14, 47, 106, 108, 154]. Dafür ergaben sich keine Unterschiede in den zweiten Komponenten des IL-12 (IL-12p19) und des IL-23 (IL-23p35).

Der Grund warum nur die IL-12/IL-23p40 Komponente in unserem Modell einen Unterschied ergibt könnte dadurch erklärt werden, dass das IL-1β während einer *C. rodentium* Infektion einen größeren Einfluss auf die ILC hat. Dennoch sind die Unterschiede im IL-1β und im IL12/IL23p40 eindeutig signifikant.

Wir konnten somit einen weiteren Teil des Mechanismus aufdeckten, in dem wir herausgefunden haben, dass die Interleukinproduktion indirekt von den CX_3CR1 MP gesteuert wird und der Hauptanteil des IL-22 besonders in der ersten Phase der Infektion mit *C. rodentium* von den ILC22 exprimiert wird.

4.4 Innate lymphoid cells 22 induzieren die Expression antimikrobieller Peptiden

Um den Mechanismus vollständig zu entschlüsseln, muss die Frage nach der Regulationsfunktion des IL-22 geklärt werden. Wie oben beschrieben, hat IL-22 einen regulatorischen Einfluss auf Epithelzellen [131, 132, 172]. Diese exprimieren nach der Exposition mit IL-22 verstärkt antimikrobielle Peptide, auch bekannt als Defensine [132, 139, 140, 174, 180].

Andere Gruppen haben bereits gezeigt, dass nach einer Infektion mit *C. rodentium* durch IL-22 zwei wesentliche Defensine induziert werden, das REGIIIβ und das REGIIIγ [19, 91, 132, 180].

Diese Defensine wurden von uns ebenfalls während der Infektion mit *C. rodentium* in B6 Kontrollen und in homo- und heterozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen gemessen (Abb. 21 B, C). Die Untersuchung des REGIIIβ und des REGIIIγ in unserem Modell ergab, signifikante Unterschiede zwischen B6 und homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen. So exprimieren B6 Mäuse einen deutlich höheren Anteil an REGIIIβ und REGIIIγ, im Vergleich zu homozygoten CX_3CR1-GFP Mäusen.
Der gesamte Mechanismus kann nun durch diesen letzten Teil zusammengefügt werden. So scheint ein Knockout des CX_3CR1 einen indirekten Einfluss auf die Produktion von antimikrobiellen Peptiden zu haben, welche wiederum das Bakterium klären. So lässt sich konkretisieren, warum die CX_3CR1-GFP Mäuse eine längere Klärungszeit des *C. rodentium* haben, aber auch die Barrierefunktion der Darmschleimhaut gestört ist.

4.5 Schlussfolgerung

Wir konnten mittels unseres *C. rodentium* Infektionsmodells, welches eine Kolitis ähnlich wie *EPEC* in Mäusen herbeiführt, einen weiteren immunologischen Mechanismus aufdecken wie das Bakterium beseitigt werden kann.
Uns war es möglich einen Bezug der CX_3CR1 MP während einer Infektion mit einem Pathogen herzustellen. Dies ist besonders interessant, da die mukosale Immunologie nicht vollständig verstanden ist und viele Mechanismen noch unbekannt sind. Wir haben somit zeigen können, dass die Abwehr des *C. rodentium* vor allem während der frühen Phase der Infektion von den CX_3CR1 MP abhängig ist. So scheinen die Bakterien nach der Infektion, mit den Epithelzellen zu interagieren (Abb. 28).
Die Interaktion führt zu einer verstärkten Ausschüttung von CX_3CL1. Gleichzeitig kann *C. rodentium* von den CX_3CR1 MP aufgenommen werden. Diese CX_3CR1 MP sind $CD11c^+$ und $F4/80^+$ und beginnen mit der Expression von IL-1β und IL-12/IL-23p40. Diese beiden IL induzieren die ILC, welche die Expression von IL-22 stimulieren.
Das IL-22 wird von den ILC in den ersten 8 Tagen der Infektion besonders stark exprimiert. Durch das IL-22 werden die Epithelzellen der Darmschleimhaut induziert antimikrobielle Peptide zu exprimieren.

In unserem Model wurde die Induktion der Expression von antimikrobiellen Peptiden am Expressionslevel von REGIIIβ und REGIIIγ verdeutlicht. Die Bakterien können durch die verstärkt ausgeschütteten antimikrobiellen Peptide besser bekämpft und somit auch geklärt werden.

Der Regulationsmechanismus mittels CX_3CR1 MP in Verbindung mit *C. rodentium* ist kaum erforscht. Zwar ist bekannt, dass ILC22 und IL22 eine besondere Rolle bei der Abwehr von Bakterien und auch von *C. rodentium* spielen, der genaue Mechanismus ist aber unklar.

Wir haben zum ersten Mal zeigen können, dass CX_3CR1 MP, (welche wir eindeutig eingrenzen konnten), einen regulatorischen Einfluss auf ILC22 haben und dass diese mittels antimikrobieller Peptide das *C. rodentium* erfolgreich bekämpfen können.

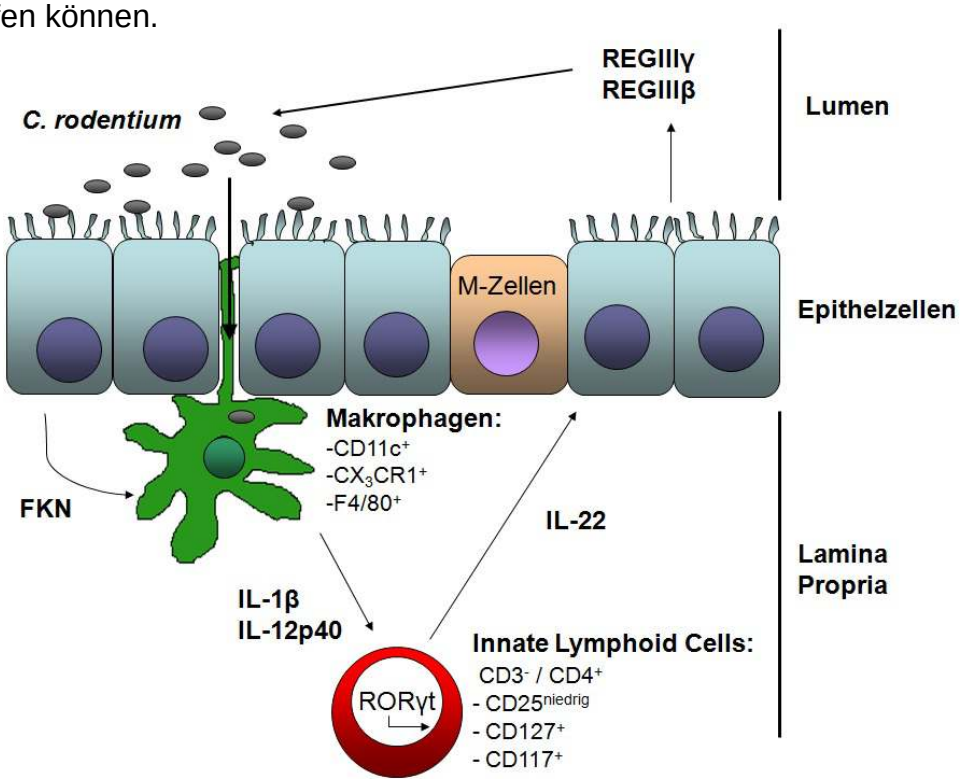


Abbildung 28. Mechanismus einer "Innate lymphoid cell" (ILC) 22 gerichteten *C. rodentium* Abwehr.

C. rodentium kommt in Kontakt mit den Epithelzellen und besiedelt diese. Gleichzeitig produziert es Virulenzfaktoren. Die Infektion regt die Epithelzellen zur Expression von Fraktalkin (FKN) an. Die CX_3CR1^+ Makrophagen exprimieren Interleukin (IL)-1β und IL12p40. Die ILC, welche "RAR-related orphan receptor" (ROR) γt^+ sind, beginnen mit der Expression von IL-22. Das IL-22 richtet sich an die Epithelzellen, welche daraufhin antimikrobiellen Peptide ausschütten. [Abkürzungen: CD – " Cluster of differentiation; CX_3CR1 – Fraktalkinrezeptor; F4/80 – Makrophagenmarker; M-Zellen – "Mircofold"- Zellen; Reg - Regenerating islet-derived protein]

5. Zusammenfassung

Citrobacter rodentium ist ein gram-negatives Bakterium, welches ein Mauspathogen darstellt. Die Infektion äußert sich durch Hyperplasie des Kolons. *C. rodentium* verwendet ein „attaching and effaching“ Läsionsmechanismus und ein Typ 3 Injektionssystem. Die Infektion mit dem murinen *Citrobacter rodentium* stellt ein Model für eine Infektion mit dem humanen Enteropathogen *Eschrichia coli* dar. *C. rodentium* verursacht eine mukosale Inflammation. Das Bakterium hat besonders engen Kontakt mit Fraktalkinrezeptor/CX_3CR1 Makrophagen. Die CX_3CR1 Makrophagen haben über Interleukin (IL)-1β und IL-12/IL-23p40 einen Einfluss auf eine kleine Lymphozyten-Population des angeborenen Immunsystems. Dabei handelt es sich um “Cluster of differentiation“ $(CD)4^+$ RORγt $^+CD3^-$ „Innate lymphoid cells“ (ILC), welche eine entscheidende Rolle bei der Klärung der *Citrobacter* Infektion spielen. Die $CD4^+RORγt^+CD3^-$ ILC schütten als Reaktion auf die Infektion IL-22 aus. Das IL-22 wirkt auf die Epithelzellen, die mit der verstärkten Expression antimikrobieller Peptide beginnen.

Der Infektionsverlauf mit *C. rodentium* wurde in der C57/Bl6, in der CX_3CR1-GFP, in der CD11c.DOG und der CX_3CR1-GFP x $RAG^{-/-}$ Maus untersucht. Die Lymphozytenpopulationen wurden dabei mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Der Infektionsgrad mit *C. rodentium* wurde mit Nalidixinplatten aus Stuhl und Organen ermittelt. Außerdem wurden *ex vivo* Imaging Analysen durchgeführt um GFP positive Zellen und mRuby *C. rodentium* nachzuweisen. Die relative Expression wurde von uns mittels quantitativer Realtime Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) ermittelt. Wir konnten anhand einer Infektionskurve aus Stuhlproben feststellen, dass CX_3CR1-GFP Mäuse längere Zeit benötigen, um *C. rodentium* nach einer Infektion erfolgreich zu beseitigen, im Vergleich zu C57/Bl6 Kontrolltieren. Des Weiteren war der Anteil an *C. rodentium,* der in verschiedenen Organen wie Leber, Milz und den mesenterischen Lymphknoten gefunden wurde, in CX_3CR1-GFP Tieren deutlich erhöht im Vergleich zu den C57/Bl6 Kontrollen. Die CX_3CR1 Makrophagen akkumulieren nach der Infektion mit dem Bakterium in der Kolon Lamina Propria (KLP). Es konnte auch mittels einem rot fluoreszierenden *C. rodentium (*RF-*C. rodentium*) eine Ko-Lokalisation und Phagozytose durch diese Makrophagen festgestellt werden. Nach der

Untersuchung unterschiedlicher Zytokine konnte das IL-22 ermittelt werden, dass in CX_3CR1-GFP Mäusen im Vergleich zu C57/Bl6 signifikant reduziert ist. Wir konnten auch zeigen, dass nach der spezifischen Depletion von CD11c CX_3CR1 positiven Zellen mit Diphterietoxin das Überleben der Mäuse und die IL-22 Expression vermindert sind. Die Analyse verschiedener Zellmarker mittels Durchflusszytometrie ergab, dass die ILC RORγt^{+}, CD25^{niedrig}, CD127^{+} und CD117^{+} sind.

Die weitere Untersuchung der CX_3CR1 Knockout Mäuse hat ergeben, dass durch die verminderte Ausschüttung von IL-22 auch der Anteil an antimikrobiellen Peptiden gesenkt ist, was durch qRT-PCR ermittelt wurde.

Diese Ergebnisse bringen uns zu dem Schluss, dass Fraktalkin über die CD4^{+} CD3^{-} ILC die Expression von IL-22 kontrolliert. Das IL-22 wiederum wirkt auf die Ephitelzellen des Kolons, welche antimikrobielle Peptide produzieren und somit zur Beseitigung des Bakteriums beitragen.

6. Literaturverzeichnis

1. Aamodt K (2011) Higher harmonic anisotropic flow measurements of charged particles in Pb-Pb collisions at sqrt(s(NN)) = 2.76 TeV. Physical review letters 107:032301
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S: Cellular and Molecular Imunology. Saunders S. 1-263 (Kap. 1-11) (2007)
3. Adams JJ, Narayanan S, Liu BY, Birnbaum ME, Kruse AC, Bowerman NA, Chen W, Levin AM, Connolly JM, Zhu C, Kranz DM, Garcia KC (2011) T Cell Receptor Signaling Is Limited by Docking Geometry to Peptide-Major Histocompatibility Complex. Immunity 35:681-693
4. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, Yagita H, Ishii N, Evans R, Honda K, Takeda K (2008) ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. Nature 455:808-812
5. Autenrieth SE, Warnke P, Wabnitz GH, Lucero Estrada C, Pasquevich KA, Drechsler D, Gunter M, Hochweller K, Novakovic A, Beer-Hammer S, Samstag Y, Hammerling GJ, Garbi N, Autenrieth IB (2012) Depletion of dendritic cells enhances innate anti-bacterial host defense through modulation of phagocyte homeostasis. PLoS pathogens 8:e1002552
6. Barthold SW, Coleman GL, Bhatt PN, Osbaldiston GW, Jonas AM (1976) The etiology of transmissible murine colonic hyperplasia. Laboratory animal science 26:889-894
7. Bartlett NW, Walton RP, Edwards MR, Aniscenko J, Caramori G, Zhu J, Glanville N, Choy KJ, Jourdan P, Burnet J, Tuthill TJ, Pedrick MS, Hurle MJ, Plumpton C, Sharp NA, Bussell JN, Swallow DM, Schwarze J, Guy B, Almond JW, Jeffery PK, Lloyd CM, Papi A, Killington RA, Rowlands DJ, Blair ED, Clarke NJ, Johnston SL (2008) Mouse models of rhinovirus-induced disease and exacerbation of allergic airway inflammation. Nature medicine 14:199-204
8. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ (1997) A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. Nature 385:640-644
9. Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG (1995) hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. FEBS letters 368:331-335
10. Bergstrom KS, Sham HP, Zarepour M, Vallance BA (2012) Innate host responses to enteric bacterial pathogens: a balancing act between resistance and tolerance. Cellular microbiology 14:475-484
11. Boehm T, Iwanami N, Hess I (2012) Evolution of the Immune System in the Lower Vertebrates. Annual review of genomics and human genetics
12. Bogunovic M, Ginhoux F, Helft J, Shang L, Hashimoto D, Greter M, Liu K, Jakubzick C, Ingersoll MA, Leboeuf M, Stanley ER, Nussenzweig M, Lira SA, Randolph GJ, Merad M (2009) Origin of the lamina propria dendritic cell network. Immunity 31:513-525
13. Boniotto M, Pirulli D, Verga Falzacappa MV, Trevisiol C, Gerarduzzi T, Crovella S (2003) Localization and expression of two human b-defensins (HBD-1 and HBD-2) in intestinal biopsies of celiac patients. European journal of histochemistry : EJH 47:389-392
14. Boulay JL, O'Shea JJ, Paul WE (2003) Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. Immunity 19:159-163

15. Brennan MJ, Li ZM, Cowell JL, Bisher ME, Steven AC, Novotny P, Manclark CR (1988) Identification of a 69-kilodalton nonfimbrial protein as an agglutinogen of Bordetella pertussis. Infection and immunity 56:3189-3195
16. Brickshawana A, Shapiro VS, Kita H, Pease LR (2011) Lineage(-)Sca1+c-Kit(-)CD25+ cells are IL-33-responsive type 2 innate cells in the mouse bone marrow. J Immunol 187:5795-5804
17. Bry L, Brenner MB (2004) Critical role of T cell-dependent serum antibody, but not the gut-associated lymphoid tissue, for surviving acute mucosal infection with Citrobacter rodentium, an attaching and effacing pathogen. J Immunol 172:433-441
18. Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, Ivanov, II, Littman DR, Maloy KJ, Powrie F (2010) Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. Nature 464:1371-1375
19. Cella M, Fuchs A, Vermi W, Facchetti F, Otero K, Lennerz JK, Doherty JM, Mills JC, Colonna M (2009) A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. Nature 457:722-725
20. Chandrasekar B, Mummidi S, Perla RP, Bysani S, Dulin NO, Liu F, Melby PC (2003) Fractalkine (CX3CL1) stimulated by nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent inflammatory signals induces aortic smooth muscle cell proliferation through an autocrine pathway. The Biochemical journal 373:547-558
21. Chen CC, Louie S, McCormick B, Walker WA, Shi HN (2005) Concurrent infection with an intestinal helminth parasite impairs host resistance to enteric Citrobacter rodentium and enhances Citrobacter-induced colitis in mice. Infection and immunity 73:5468-5481
22. Cipriani R, Villa P, Chece G, Lauro C, Paladini A, Micotti E, Perego C, De Simoni MG, Fredholm BB, Eusebi F, Limatola C (2011) CX3CL1 is neuroprotective in permanent focal cerebral ischemia in rodents. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 31:16327-16335
23. Deng W, Li Y, Vallance BA, Finlay BB (2001) Locus of enterocyte effacement from Citrobacter rodentium: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. Infection and immunity 69:6323-6335
24. Deng W, Yu HB, de Hoog CL, Stoynov N, Li Y, Foster LJ, Finlay BB (2012) Quantitative proteomic analysis of type III secretome of enteropathogenic Escherichia coli reveals an expanded effector repertoire for attaching/effacing bacterial pathogens. Molecular & cellular proteomics : MCP
25. Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur M, Maloy WL, Bevins CL (1991) Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88:3952-3956
26. Dohi T, Fujihashi K, Rennert PD, Iwatani K, Kiyono H, McGhee JR (1999) Hapten-induced colitis is associated with colonic patch hypertrophy and T helper cell 2-type responses. The Journal of experimental medicine 189:1169-1180
27. Dohi T, Rennert PD, Fujihashi K, Kiyono H, Shirai Y, Kawamura YI, Browning JL, McGhee JR (2001) Elimination of colonic patches with lymphotoxin beta receptor-Ig prevents Th2 cell-type colitis. J Immunol 167:2781-2790

28. Donaldson JG, Finazzi D, Klausner RD (1992) Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. Nature 360:350-352
29. Eberl G (2012) Development and evolution of RORgammat+ cells in a microbe's world. Immunological reviews 245:177-188
30. Edelson BT, Kc W, Juang R, Kohyama M, Benoit LA, Klekotka PA, Moon C, Albring JC, Ise W, Michael DG, Bhattacharya D, Stappenbeck TS, Holtzman MJ, Sung SS, Murphy TL, Hildner K, Murphy KM (2010) Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. The Journal of experimental medicine 207:823-836
31. Ediger RD, Kovatch RM, Rabstein MM (1974) Colitis in mice with a high incidence of rectal prolapse. Laboratory animal science 24:488-494
32. Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI, Smith AV, Tobin MD, Verwoert GC (2011) Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. Nature 478:103-109
33. Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LC, McNamara BP, Donnenberg MS, Kaper JB (1998) The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic Escherichia coli E2348/69. Molecular microbiology 28:1-4
34. Fallon PG, Ballantyne SJ, Mangan NE, Barlow JL, Dasvarma A, Hewett DR, McIlgorm A, Jolin HE, McKenzie AN (2006) Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. The Journal of experimental medicine 203:1105-1116
35. Frankel G, Phillips AD (2008) Attaching effacing Escherichia coli and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. Cellular microbiology 10:549-556
36. Garcia GE, Xia Y, Chen S, Wang Y, Ye RD, Harrison JK, Bacon KB, Zerwes HG, Feng L (2000) NF-kappaB-dependent fractalkine induction in rat aortic endothelial cells stimulated by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS. Journal of leukocyte biology 67:577-584
37. Garmendia J, Frankel G, Crepin VF (2005) Enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli infections: translocation, translocation, translocation. Infection and immunity 73:2573-2585
38. Garrett WS, Lord GM, Punit S, Lugo-Villarino G, Mazmanian SK, Ito S, Glickman JN, Glimcher LH (2007) Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. Cell 131:33-45
39. Gascoyne DM, Long E, Veiga-Fernandes H, de Boer J, Williams O, Seddon B, Coles M, Kioussis D, Brady HJ (2009) The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. Nature immunology 10:1118-1124
40. Ghaem-Maghami M, Simmons CP, Daniell S, Pizza M, Lewis D, Frankel G, Dougan G (2001) Intimin-specific immune responses prevent bacterial colonization by the attaching-effacing pathogen Citrobacter rodentium. Infection and immunity 69:5597-5605
41. Gursoy UK, Kononen E (2012) Understanding the roles of gingival beta-defensins. Journal of oral microbiology 4
42. Hapfelmeier S, Ehrbar K, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Hardt WD (2004) Role of the Salmonella pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in Salmonella enterica subspecies 1 serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. Infection and immunity 72:795-809

43. Higgins LM, Frankel G, Connerton I, Goncalves NS, Dougan G, MacDonald TT (1999) Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation. Science 285:588-591
44. Higgins LM, Frankel G, Douce G, Dougan G, MacDonald TT (1999) Citrobacter rodentium infection in mice elicits a mucosal Th1 cytokine response and lesions similar to those in murine inflammatory bowel disease. Infection and immunity 67:3031-3039
45. Hochweller K, Striegler J, Hammerling GJ, Garbi N (2008) A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells. Eur J Immunol 38:2776-2783
46. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ (2012) Interactions between the microbiota and the immune system. Science 336:1268-1273
47. Hunter CA (2005) New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. Nature reviews Immunology 5:521-531
48. Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, Gilbert JM, Clifford T, Kwan S, Menon S, Seymour B, Jackson C, Kung TT, Brieland JK, Zurawski SM, Chapman RW, Zurawski G, Coffman RL (2002) New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. J Immunol 169:443-453
49. Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K (2004) Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. Journal of atherosclerosis and thrombosis 11:15-21
50. Iwasaki A, Kelsall BL (1999) Mucosal immunity and inflammation. I. Mucosal dendritic cells: their specialized role in initiating T cell responses. The American journal of physiology 276:G1074-1078
51. Iwasaki A, Medzhitov R (2010) Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Science 327:291-295
52. Iwata M, Ohoka Y, Kuwata T, Asada A (1996) Regulation of T cell apoptosis via T cell receptors and steroid receptors. Stem Cells 14:632-641
53. Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. Annual review of immunology 20:197-216
54. Johansson-Lindbom B, Svensson M, Pabst O, Palmqvist C, Marquez G, Forster R, Agace WW (2005) Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. The Journal of experimental medicine 202:1063-1073
55. Johansson F, Kramer F, Barnhart S, Kanter JE, Vaisar T, Merrill RD, Geng L, Oka K, Chan L, Chait A, Heinecke JW, Bornfeldt KE (2008) Type 1 diabetes promotes disruption of advanced atherosclerotic lesions in LDL receptor-deficient mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:2082-2087
56. Johansson ME, Larsson JM, Hansson GC (2011) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108 Suppl 1:4659-4665
57. Johansson P, Wiltschi B, Kumari P, Kessler B, Vonrhein C, Vonck J, Oesterhelt D, Grininger M (2008) Inhibition of the fungal fatty acid synthase type I multienzyme complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:12803-12808
58. Kamizono S, Duncan GS, Seidel MG, Morimoto A, Hamada K, Grosveld G, Akashi K, Lind EF, Haight JP, Ohashi PS, Look AT, Mak TW (2009)

Nfil3/E4bp4 is required for the development and maturation of NK cells in vivo. The Journal of experimental medicine 206:2977-2986
59. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic Escherichia coli. Nature reviews Microbiology 2:123-140
60. Kelsall B (2008) Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages. Mucosal immunology 1:460-469
61. Kelsall BL (2008) A focus on dendritic cells and macrophages as key regulators of mucosal immunity. Mucosal immunology 1:423-424
62. Kieper WC, Troy A, Burghardt JT, Ramsey C, Lee JY, Jiang HQ, Dummer W, Shen H, Cebra JJ, Surh CD (2005) Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion. J Immunol 174:3158-3163
63. Kim YS, Ho SB (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. Current gastroenterology reports 12:319-330
64. Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly RP, Pestka S (2001) Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. The Journal of biological chemistry 276:2725-2732
65. Kredel S, Oswald F, Nienhaus K, Deuschle K, Rocker C, Wolff M, Heilker R, Nienhaus GU, Wiedenmann J (2009) mRuby, a bright monomeric red fluorescent protein for labeling of subcellular structures. PloS one 4:e4391
66. Kretschmer K, Apostolou I, Verginis P, von Boehmer H (2008) Regulatory T cells and antigen-specific tolerance. Chemical immunology and allergy 94:8-15
67. Laffont S, Siddiqui KR, Powrie F (2010) Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103+ dendritic cells. Eur J Immunol 40:1877-1883
68. Lee AY, Chang SY, Kim JI, Cha HR, Jang MH, Yamamoto M, Kweon MN (2008) Dendritic cells in colonic patches and iliac lymph nodes are essential in mucosal IgA induction following intrarectal administration via CCR7 interaction. Eur J Immunol 38:1127-1137
69. Lee JS, Cella M, Colonna M (2012) AHR and the Transcriptional Regulation of Type-17/22 ILC. Frontiers in immunology 3:10
70. Levillayer F, Mas M, Levi-Acobas F, Brahic M, Bureau JF (2007) Interleukin 22 is a candidate gene for Tmevp3, a locus controlling Theiler's virus-induced neurological diseases. Genetics 176:1835-1844
71. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, Schlegel ML, Tucker TA, Schrenzel MD, Knight R, Gordon JI (2008) Evolution of mammals and their gut microbes. Science 320:1647-1651
72. Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI (2008) Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. Nature reviews Microbiology 6:776-788
73. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA (2006) Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. The Journal of experimental medicine 203:2271-2279
74. Liu H, Jiang D (2011) Fractalkine/CX3CR1 and atherosclerosis. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 412:1180-1186

75. Lorenz RG, Chaplin DD, McDonald KG, McDonough JS, Newberry RD (2003) Isolated lymphoid follicle formation is inducible and dependent upon lymphotoxin-sufficient B lymphocytes, lymphotoxin beta receptor, and TNF receptor I function. J Immunol 170:5475-5482
76. Luperchio SA, Newman JV, Dangler CA, Schrenzel MD, Brenner DJ, Steigerwalt AG, Schauer DB (2000) Citrobacter rodentium, the causative agent of transmissible murine colonic hyperplasia, exhibits clonality: synonymy of C. rodentium and mouse-pathogenic Escherichia coli. Journal of clinical microbiology 38:4343-4350
77. Luperchio SA, Schauer DB (2001) Molecular pathogenesis of Citrobacter rodentium and transmissible murine colonic hyperplasia. Microbes and infection / Institut Pasteur 3:333-340
78. Maaser C, Housley MP, Iimura M, Smith JR, Vallance BA, Finlay BB, Schreiber JR, Varki NM, Kagnoff MF, Eckmann L (2004) Clearance of Citrobacter rodentium requires B cells but not secretory immunoglobulin A (IgA) or IgM antibodies. Infection and immunity 72:3315-3324
79. Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM (2000) A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. Science 288:2222-2226
80. Macpherson AJ, Uhr T (2004) Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. Science 303:1662-1665
81. Macpherson AJ, Slack E, Geuking MB, McCoy KD (2009) The mucosal firewalls against commensal intestinal microbes. Seminars in immunopathology 31:145-149
82. Matsumiya T, Ota K, Imaizumi T, Yoshida H, Kimura H, Satoh K (2010) Characterization of synergistic induction of CX3CL1/fractalkine by TNF-alpha and IFN-gamma in vascular endothelial cells: an essential role for TNF-alpha in post-transcriptional regulation of CX3CL1. J Immunol 184:4205-4214
83. McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92:1664-1668
84. McFall-Ngai M (2007) Adaptive immunity: care for the community. Nature 445:153
85. Medina-Contreras O, Geem D, Laur O, Williams IR, Lira SA, Nusrat A, Parkos CA, Denning TL (2011) CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. The Journal of clinical investigation 121:4787-4795
86. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. Science 296:298-300
87. Misse D, Yssel H, Trabattoni D, Oblet C, Lo Caputo S, Mazzotta F, Pene J, Gonzalez JP, Clerici M, Veas F (2007) IL-22 participates in an innate anti-HIV-1 host-resistance network through acute-phase protein induction. J Immunol 178:407-415
88. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. Cell 68:869-877
89. Muller AJ, Kaiser P, Dittmar KE, Weber TC, Haueter S, Endt K, Songhet P, Zellweger C, Kremer M, Fehling HJ, Hardt WD (2012) Salmonella gut invasion involves TTSS-2-dependent epithelial traversal, basolateral exit, and uptake by epithelium-sampling lamina propria phagocytes. Cell host & microbe 11:19-32

90. Muller CA, Autenrieth IB, Peschel A (2005) Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. Cellular and molecular life sciences : CMLS 62:1297-1307
91. Mundy R, MacDonald TT, Dougan G, Frankel G, Wiles S (2005) Citrobacter rodentium of mice and man. Cellular microbiology 7:1697-1706
92. Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H, Kronenberg M (2009) Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. Nature immunology 10:1178-1184
93. Murphy K, Travers P, Walport M: Janeway Immuno Biology. Garland Science: 7 Edition, S. 1-317 (Kap. 1-7) (2008)
94. Muto T, Nakagawa M, Isobe Y, Saito M, Nakano T (1969) Infectious megaenteron of mice. I. Manifestation and pathological observation. Japanese journal of medical science & biology 22:363-374
95. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, Bucks C, Kane CM, Fallon PG, Pannell R, Jolin HE, McKenzie AN (2010) Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. Nature 464:1367-1370
96. Newberry RD, Lorenz RG (2005) Organizing a mucosal defense. Immunological reviews 206:6-21
97. Nicoletti C, Arques JL, Bertelli E (2010) CX(3)CR1 is critical for Salmonella-induced migration of dendritic cells into the intestinal lumen. Gut microbes 1:131-134
98. Niess JH, Adler G Enteric Flora Expands Gut Lamina Propria CX3CR1+ Dendritic Cells Supporting Inflammatory Immune Responses under Normal and Inflammatory Conditions. J Immunol
99. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC (2005) CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. Science 307:254-258
100. Niess JH, Reinecker HC (2006) Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota. Cellular microbiology 8:558-564
101. Niess JH (2008) Role of mucosal dendritic cells in inflammatory bowel disease. World journal of gastroenterology : WJG 14:5138-5148
102. Niess JH, Leithauser F, Adler G, Reimann J (2008) Commensal gut flora drives the expansion of proinflammatory CD4 T cells in the colonic lamina propria under normal and inflammatory conditions. J Immunol 180:559-568
103. Niess JH (2009) Role of gut-resident dendritic cells in inflammatory bowel disease. Expert Rev Clin Immunol 5:451-461
104. Niess JH (2010) What are CX3CR1+ mononuclear cells in the intestinal mucosa? Gut Microbes 1:396-400
105. Niess JH, Adler G (2010) Enteric flora expands gut lamina propria CX3CR1+ dendritic cells supporting inflammatory immune responses under normal and inflammatory conditions. J Immunol 184:2026-2037
106. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. Immunity 13:715-725
107. Ota N, Wong K, Valdez PA, Zheng Y, Crellin NK, Diehl L, Ouyang W (2011) IL-22 bridges the lymphotoxin pathway with the maintenance of colonic

lymphoid structures during infection with Citrobacter rodentium. Nature immunology 12:941-948
108. Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell AM, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, de Waal Malefyt R, Moore KW (2002) A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. J Immunol 168:5699-5708
109. Pazgier M, Li X, Lu W, Lubkowski J (2007) Human defensins: synthesis and structural properties. Current pharmaceutical design 13:3096-3118
110. Perna NT, Mayhew GF, Posfai G, Elliott S, Donnenberg MS, Kaper JB, Blattner FR (1998) Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. Infection and immunity 66:3810-3817
111. Petty NK, Bulgin R, Crepin VF, Cerdeno-Tarraga AM, Schroeder GN, Quail MA, Lennard N, Corton C, Barron A, Clark L, Toribio AL, Parkhill J, Dougan G, Frankel G, Thomson NR (2010) The Citrobacter rodentium genome sequence reveals convergent evolution with human pathogenic Escherichia coli. Journal of bacteriology 192:525-538
112. Petty NK, Feltwell T, Pickard D, Clare S, Toribio AL, Fookes M, Roberts K, Monson R, Nair S, Kingsley RA, Bulgin R, Wiles S, Goulding D, Keane T, Corton C, Lennard N, Harris D, Willey D, Rance R, Yu L, Choudhary JS, Churcher C, Quail MA, Parkhill J, Frankel G, Dougan G, Salmond GP, Thomson NR (2011) Citrobacter rodentium is an unstable pathogen showing evidence of significant genomic flux. PLoS pathogens 7:e1002018
113. Platt AM, Bain CC, Bordon Y, Sester DP, Mowat AM (2010) An independent subset of TLR expressing CCR2-dependent macrophages promotes colonic inflammation. J Immunol 184:6843-6854
114. Podolsky DK (2002) Inflammatory bowel disease. The New England journal of medicine 347:417-429
115. Podolsky DK (2002) The current future understanding of inflammatory bowel disease. Best practice & research Clinical gastroenterology 16:933-943
116. Price AE, Liang HE, Sullivan BM, Reinhardt RL, Eisley CJ, Erle DJ, Locksley RM (2010) Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107:11489-11494
117. Qiu J, Heller JJ, Guo X, Chen ZM, Fish K, Fu YX, Zhou L (2012) The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through modulation of innate lymphoid cells. Immunity 36:92-104
118. Randall TD, Carragher DM, Rangel-Moreno J (2008) Development of secondary lymphoid organs. Annual review of immunology 26:627-650
119. Reddy EA, Shaw AV, Crump JA (2010) Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. The Lancet infectious diseases 10:417-432
120. Renauld JC (2003) Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. Nature reviews Immunology 3:667-676
121. Riedel CU, Casey PG, Mulcahy H, O'Gara F, Gahan CG, Hill C (2007) Construction of p16Slux, a novel vector for improved bioluminescent labeling of gram-negative bacteria. Appl Environ Microbiol 73:7092-7095

122. Rimoldi M, Chieppa M, Vulcano M, Allavena P, Rescigno M (2004) Intestinal epithelial cells control dendritic cell function. Annals of the New York Academy of Sciences 1029:66-74
123. Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, Nespoli A, Viale G, Allavena P, Rescigno M (2005) Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. Nature immunology 6:507-514
124. Rivollier A, He J, Kole A, Valatas V, Kelsall BL (2012) Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. The Journal of experimental medicine 209:139-155
125. Salzman NH, Chou MM, de Jong H, Liu L, Porter EM, Paterson Y (2003) Enteric salmonella infection inhibits Paneth cell antimicrobial peptide expression. Infection and immunity 71:1109-1115
126. Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y, Bevins CL (2003) Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. Nature 422:522-526
127. Sanos SL, Bui VL, Mortha A, Oberle K, Heners C, Johner C, Diefenbach A (2009) RORgammat and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. Nature immunology 10:83-91
128. Santos RL, Baumler AJ (2004) Cell tropism of Salmonella enterica. International journal of medical microbiology : IJMM 294:225-233
129. Satoh-Takayama N, Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S, Sawa S, Lochner M, Rattis F, Mention JJ, Thiam K, Cerf-Bensussan N, Mandelboim O, Eberl G, Di Santo JP (2008) Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. Immunity 29:958-970
130. Satoh-Takayama N, Dumoutier L, Lesjean-Pottier S, Ribeiro VS, Mandelboim O, Renauld JC, Vosshenrich CA, Di Santo JP (2009) The natural cytotoxicity receptor NKp46 is dispensable for IL-22-mediated innate intestinal immune defense against Citrobacter rodentium. J Immunol 183:6579-6587
131. Sawa S, Cherrier M, Lochner M, Satoh-Takayama N, Fehling HJ, Langa F, Di Santo JP, Eberl G (2010) Lineage relationship analysis of RORgammat+ innate lymphoid cells. Science 330:665-669
132. Sawa S, Lochner M, Satoh-Takayama N, Dulauroy S, Berard M, Kleinschek M, Cua D, Di Santo JP, Eberl G (2011) RORgammat+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. Nature immunology 12:320-326
133. Schauer DB, Falkow S (1993) Attaching and effacing locus of a Citrobacter freundii biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. Infection and immunity 61:2486-2492
134. Schauer DB, Zabel BA, Pedraza IF, O'Hara CM, Steigerwalt AG, Brenner DJ (1995) Genetic and biochemical characterization of Citrobacter rodentium sp. nov. Journal of clinical microbiology 33:2064-2068
135. Schwiebert LM (2005) Chemokines, Chemokine Receptors, and Disease. Elsevier
136. Shiomi H, Masuda A, Nishiumi S, Nishida M, Takagawa T, Shiomi Y, Kutsumi H, Blumberg RS, Azuma T, Yoshida M (2010) Gamma interferon produced by antigen-specific CD4+ T cells regulates the mucosal immune responses to Citrobacter rodentium infection. Infection and immunity 78:2653-2666

137. Siddiqui KR, Laffont S, Powrie F (2010) E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis. Immunity 32:557-567
138. Simmons CP, Goncalves NS, Ghaem-Maghami M, Bajaj-Elliott M, Clare S, Neves B, Frankel G, Dougan G, MacDonald TT (2002) Impaired resistance and enhanced pathology during infection with a noninvasive, attaching-effacing enteric bacterial pathogen, Citrobacter rodentium, in mice lacking IL-12 or IFN-gamma. J Immunol 168:1804-1812
139. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D (2011) Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. Nature immunology 12:383-390
140. Sonnenberg GF, Monticelli LA, Elloso MM, Fouser LA, Artis D (2011) CD4(+) lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut. Immunity 34:122-134
141. Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, Fung TC, Hutnick NA, Kunisawa J, Shibata N, Grunberg S, Sinha R, Zahm AM, Tardif MR, Sathaliyawala T, Kubota M, Farber DL, Collman RG, Shaked A, Fouser LA, Weiner DB, Tessier PA, Friedman JR, Kiyono H, Bushman FD, Chang KM, Artis D (2012) Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. Science 336:1321-1325
142. Spahn TW, Maaser C, Eckmann L, Heidemann J, Lugering A, Newberry R, Domschke W, Herbst H, Kucharzik T (2004) The lymphotoxin-beta receptor is critical for control of murine Citrobacter rodentium-induced colitis. Gastroenterology 127:1463-1473
143. Spehlmann ME, Dann SM, Hruz P, Hanson E, McCole DF, Eckmann L (2009) CXCR2-dependent mucosal neutrophil influx protects against colitis-associated diarrhea caused by an attaching/effacing lesion-forming bacterial pathogen. J Immunol 183:3332-3343
144. Spits H, Di Santo JP (2011) The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. Nature immunology 12:21-27
145. Stephani J, Radulovic K, Niess JH (2011) Gut microbiota, probiotics and inflammatory bowel disease. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 59:161-177
146. Strober W (2009) The multifaceted influence of the mucosal microflora on mucosal dendritic cell responses. Immunity 31:377-388
147. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y (2007) Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. The Journal of experimental medicine 204:1775-1785
148. Symonds EL, Riedel CU, O'Mahony D, Lapthorne S, O'Mahony L, Shanahan F (2009) Involvement of T helper type 17 and regulatory T cell activity in Citrobacter rodentium invasion and inflammatory damage. Clin Exp Immunol 157:148-154
149. Takada Y, Hisamatsu T, Kamada N, Kitazume MT, Honda H, Oshima Y, Saito R, Takayama T, Kobayashi T, Chinen H, Mikami Y, Kanai T, Okamoto S, Hibi T (2010) Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset. J Immunol 184:2671-2676
150. Takenaka M, Tiriveedhi V, Subramanian V, Hoshinaga K, Patterson AG, Mohanakumar T (2012) Antibodies to MHC Class II Molecules Induce

Autoimmunity: Critical Role for Macrophages in the Immunopathogenesis of Obliterative Airway Disease. PloS one 7:e42370
151. Takeuchi A, Sprinz H (1967) Electron-Microscope Studies of Experimental Salmonella Infection in the Preconditioned Guinea Pig: II. Response of the Intestinal Mucosa to the Invasion by Salmonella typhimurium. The American journal of pathology 51:137-161
152. Taylor RT, Williams IR (2005) Lymphoid organogenesis in the intestine. Immunologic research 33:167-181
153. Tittel AP, Heuser C, Ohliger C, Llanto C, Yona S, Hammerling GJ, Engel DR, Garbi N, Kurts C (2012) Functionally relevant neutrophilia in CD11c diphtheria toxin receptor transgenic mice. Nature methods 9:385-390
154. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA (2003) The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. Immunity 19:641-644
155. Tumanov AV, Koroleva EP, Guo X, Wang Y, Kruglov A, Nedospasov S, Fu YX (2011) Lymphotoxin controls the IL-22 protection pathway in gut innate lymphoid cells during mucosal pathogen challenge. Cell host & microbe 10:44-53
156. Vaishnava S, Hooper LV (2011) Eat your carrots! T cells are RARing to go. Immunity 34:290-292
157. Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, Ley R, Wakeland EK, Hooper LV (2011) The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. Science 334:255-258
158. Vallance BA, Deng W, Knodler LA, Finlay BB (2002) Mice lacking T and B lymphocytes develop transient colitis and crypt hyperplasia yet suffer impaired bacterial clearance during Citrobacter rodentium infection. Infection and immunity 70:2070-2081
159. Vallance BA, Deng W, Jacobson K, Finlay BB (2003) Host susceptibility to the attaching and effacing bacterial pathogen Citrobacter rodentium. Infection and immunity 71:3443-3453
160. Vallance P, Leiper J (2002) Blocking NO synthesis: how, where and why? Nature reviews Drug discovery 1:939-950
161. van de Pavert SA, Mebius RE (2010) New insights into the development of lymphoid tissues. Nature reviews Immunology 10:664-674
162. Varol C, Vallon-Eberhard A, Elinav E, Aychek T, Shapira Y, Luche H, Fehling HJ, Hardt WD, Shakhar G, Jung S (2009) Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. Immunity 31:502-512
163. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S (2011) Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. Science 331:44-49
164. Vonarbourg C, Mortha A, Bui VL, Hernandez PP, Kiss EA, Hoyler T, Flach M, Bengsch B, Thimme R, Holscher C, Honig M, Pannicke U, Schwarz K, Ware CF, Finke D, Diefenbach A (2010) Regulated expression of nuclear receptor RORgammat confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing RORgammat(+) innate lymphocytes. Immunity 33:736-751
165. Wales AD, Woodward MJ, Pearson GR (2005) Attaching-effacing bacteria in animals. Journal of comparative pathology 132:1-26
166. Walker JA, McKenzie A (2012) Innate lymphoid cells in the airways. Eur J Immunol 42:1368-1374

167. Wang Y, Koroleva EP, Kruglov AA, Kuprash DV, Nedospasov SA, Fu YX, Tumanov AV (2010) Lymphotoxin beta receptor signaling in intestinal epithelial cells orchestrates innate immune responses against mucosal bacterial infection. Immunity 32:403-413
168. Weber GF, Schlautkotter S, Kaiser-Moore S, Altmayr F, Holzmann B, Weighardt H (2007) Inhibition of interleukin-22 attenuates bacterial load and organ failure during acute polymicrobial sepsis. Infection and immunity 75:1690-1697
169. Wei OL, Hilliard A, Kalman D, Sherman M (2005) Mast cells limit systemic bacterial dissemination but not colitis in response to Citrobacter rodentium. Infection and immunity 73:1978-1985
170. Wiles S, Clare S, Harker J, Huett A, Young D, Dougan G, Frankel G (2004) Organ specificity, colonization and clearance dynamics in vivo following oral challenges with the murine pathogen Citrobacter rodentium. Cellular microbiology 6:963-972
171. Wiles S, Dougan G, Frankel G (2005) Emergence of a 'hyperinfectious' bacterial state after passage of Citrobacter rodentium through the host gastrointestinal tract. Cellular microbiology 7:1163-1172
172. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R (2004) IL-22 increases the innate immunity of tissues. Immunity 21:241-254
173. Wolk K, Sabat R (2006) Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. Cytokine & growth factor reviews 17:367-380
174. Wolk K, Witte E, Wallace E, Docke WD, Kunz S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R (2006) IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. European journal of immunology 36:1309-1323
175. Wong SH, Walker JA, Jolin HE, Drynan LF, Hams E, Camelo A, Barlow JL, Neill DR, Panova V, Koch U, Radtke F, Hardman CS, Hwang YY, Fallon PG, McKenzie AN (2012) Transcription factor RORalpha is critical for nuocyte development. Nature immunology 13:229-236
176. Yang D, Liu ZH, Tewary P, Chen Q, de la Rosa G, Oppenheim JJ (2007) Defensin participation in innate and adaptive immunity. Current pharmaceutical design 13:3131-3139
177. Yoshida M, Kobayashi K, Kuo TT, Bry L, Glickman JN, Claypool SM, Kaser A, Nagaishi T, Higgins DE, Mizoguchi E, Wakatsuki Y, Roopenian DC, Mizoguchi A, Lencer WI, Blumberg RS (2006) Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria. The Journal of clinical investigation 116:2142-2151
178. Zhang X, Yu S, Hoffmann K, Yu K, Forster R (2012) Neonatal lymph node stromal cells drive myelodendritic lineage cells into a distinct population of CX3CR1+CD11b+F4/80+ regulatory macrophages in mice. Blood 119:3975-3986
179. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W (2007) Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. Nature 445:648-651
180. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, Abbas AR, Modrusan Z, Ghilardi N, de Sauvage FJ, Ouyang W (2008) Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. Nature medicine 14:282-289

7. Anhang

Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater PD. Dr. Jan Hendrik Niess bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat in seinem Labor meine Doktorarbeit zu machen. Er hatte stets hervorragende Ideen und stand mir immer mit seinem fachlichem Wissen zur Seite. Auch meinen Kollegen (also der gesamten Arbeitsgruppe Niess) möchte ich an dieser Stelle danke sagen. Danke an Julia Geitner, Katarina Radulovic, Nathalie Birth und Valerio Rossini, die mir während meiner Doktorarbeit mit Rat und Tat zur Seite standen und mit denen ich eine schöne Zeit hatte.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Christian Riedel bedanken. In seinen Laborräumen habe ich einen Großteil meiner experimentellen Arbeit durchgeführt. Er hatte auch immer eine offenes Ohr, falls Experimenten nicht gelangen und stand mit wertvollem Rat zur Seite. Mein Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe Riedel, besonders Mark, Marita, Esther, Daria, Caro, Anne, Enzo, Verena und Julia. Ich hatte mit ihnen eine sehr schöne und lustige Zeit. Des Weiteren möchte ich Prof. Reinhold Schirmbeck danken, der mir auch während den ganzen Jahren mit wertvollem Rat zur Seite stand und auch mich auch mit vielen Ideen stets inspiriert hat und natürlich auch für die Mäusen.

Und ein Dankeschön geht auch an Gleyder, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und immer ein offenes Ohr für mich hatte, wenn mal etwas nicht so lief.

Auch bei Katarina Merkel möchte ich mich bedanken, sie hat während der gesamten Zeit auf meine Mäuse in der Isolierstation achtgegeben und hat mir auch ansonsten die Arbeit sehr angenehm gemacht.

Ich möchte mich bei meiner Freundin Linda bedanken, die mich nicht nur moralisch unterstützt hat, sondern auch meine Doktorarbeit korrekturgelesen und diese somit für jedermann verständlich gemacht hat.

Und in diesem Sinne auch ein Danke an Sofia, die meine Doktorarbeit ebenfalls korrekturgelesen hat.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern ganz herzlich bedanken. Sie haben mich nicht nur während meiner Doktorarbeit unterstützt, sonder auch während meiner Schulzeit, meines Studium … also immer. Deshalb an dieser Stelle: Danke Mama und Tata!

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name : MANTA, Calin-Petru

Geburtsort : Bukarest (Rumänien)

Publikationen

1) Fluorosomes: a convenient new reagent to detect and block multivalent and complex receptor-ligand interactions.

Hans J. Kueng, **Calin Manta**, Daniela Haiderer, Victoria M. Leb, Klaus G. Schmetterer, Alina Neunkirchner, Ruth A. Byrne, Clemens Scheinecker, Peter Steinberger, Brian Seed, and Winfried F. Pickl *FASEB Journa*l; 2010, 24 (5): 1572-82; online available

2) CD69 Regulates Type I IFN-Induced Tolerogenic Signals to Mucosal CD4 T Cells That Attenuate Their Colitogenic Potential

Katarina Radulovic, **Calin Manta**, Valerio Rossini, KarlheinzHolzmann, Hans A. Kestler, Ursula Maria Wegenka, Toshinori Nakayama and Jan Hendrik Niess *Journal of Immunology*; 2012, 188(4): 2001-13, online avaialbe

3) Tissue-specific differentiation of a circulating CCR9- pDC-like common dendritic cell precursor

Andreas Schlitzer, Alexander F. Heiseke, Henrik Einwächter, Wolfgang Reindl, Matthias Schiemann, **Calin-Petru Manta**, Peter See, Jan-Hendrik Niess, Tobias Suter, Florent Ginhoux and Anne B. Krug *Blood*; 2012, 119 (25): 6063- 71, online availble

4) CX 3 CR1 $^{+}$ macrophages support IL-22 production by innate lymphoid cells during infection with *Citrobacter rodentium*

C. Manta, E. Heupel , K. Radulovic ,V. Rossini, N. Garbi , C.U. Riedel and J.H. Niess *Mucosal Immunology*; 2012, 6(1): 177-88, online available

Auszeichnungen

1) Reisestipendium zum „2nd European Congress of Immunology" in Berlin 2009
2) Poster Preis beim jährlichen Treffen der Viszeralmedizin in Leipzig 2011
3) Reisestipendium zur „Summer School" in Kiel 2011
4) Reisestipendium zum „European Meeting of Mucosal Immunology" in Dublin 2012