

**Funktionelle Charakterisierung der Casein Kinase 2 in der  
Etablierung und Aufrechterhaltung peripherer Toleranz durch  
Dendritische Zellen**

Dissertation  
Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Bastian Gerlitzki  
Geboren am 03. Februar 1981  
in Duisburg

Mainz, Oktober 2012



Aus dem  
**Institut für Immunologie**  
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
(Leiter: Der Name wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt)  
Juli 2009 – Oktober 2012

Dekan: Der Name wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

1. Berichterstatter: Der Name wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

2. Berichterstatter: Der Name wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Immunsystem .....	1
1.2 Dendritische Zellen als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort .....	2
1.2.1 Antigenaufnahme und DC-Reifung.....	3
1.2.2 T-Zellaktivierung und Differenzierung von T-Helferzellen .....	4
1.2.3 Immunregulatorische Funktion der Dendritischen Zellen.....	6
1.3 nTreg Kontrolle über Dendritische Zellen .....	7
1.4 Casein Kinase 2 .....	8
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	10
<b>2. Material und Methode .....</b>	<b>11</b>
2.1 Tiere .....	11
2.2 Das Cre/ <i>loxP</i> Rekombinationssystem.....	12
2.2.1 Genotypisierung der CD11c-cre x CK2 $\beta^{fl/fl}$ Mäuse.....	12
2.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	14
2.4 Zellkultur: Isolation und Kulturbedingungen .....	15
2.4.1 Differenzierung von Dendritischen Zellen aus dem Knochenmark.....	15
2.4.2 MACS: Isolation von T-Zellen aus der Milz.....	16
2.4.3 Aktivierung der Tregs und Suppressionsassay.....	20
2.4.4 CFSE-Markierung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	20
2.4.5 Gewinnung von Dendritischen Zellen durch enzymatischen Organauflösung ..	21
2.4.6 Gewinnung von Makrophagen .....	21
2.4.7 Bestimmung der Lebendzellzahl .....	22
2.4.8 Stimulation von BMDCs in An- & Abwesenheit des CK2 Inhibitors DMAT ..	22
2.4.9 Stimulation mit Ionomycin und PMA .....	22
2.5 Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) .....	23
2.6 RNA-Isolation und reverse Transkription .....	24
2.7 Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	26
2.7.1 Verwendete Oligonucleotide: .....	27
2.8 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	28
2.8.1 Durchführung der FACS-Färbung.....	29
2.8.2 Verwendete FACS-Antikörper .....	30
2.9 Orale Toleranz .....	31
2.9.1 Immunmodulation durch orale Applikation von Ovalbumin .....	31
2.9.2 Immunisierung der Mäuse.....	31
2.9.3 Auslösen einer „delayed type hypersensitive“ Reaktion (DTH).....	32
2.9.4 Messung der Fußschwellung als Maß der DTH.....	32

2.10	Puffer und Lösungen .....	33
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
3.1	Expression kostimulatorischer Moleküle in Gegenwart des CK2 Inhibitors Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole (DMAT).....	35
3.2	DMAT erhöht die antigenspezifische Proliferation von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	37
3.3	Suppression von BMDCs durch Tregs in An- und Abwesenheit von DMAT .....	38
3.4	Generierung einer konditionellen knock-out Maus, CD11c-cre x CK2β <sup>fl/fl</sup> .....	39
3.5	Expression kostimulatorischer Moleküle auf WT und KO BMDCs .....	40
3.6	Bestimmung des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (IL-6).....	41
3.7	Genexpressionsanalyse von <i>Il-6</i> , <i>Il-1β</i> und <i>Aldh1a1</i> in WT und KO BMDCs .....	42
3.8	T-Zell-Proliferationsassay mit WT und KO BMDCs als akzessorische Zellen .....	44
3.9	Suppression von WT und KO BMDCs durch regulatorische T-Zellen.....	45
3.10	Analyse der kostimulatorischen Moleküle von Dendritischen Zellen <i>ex vivo</i> .....	46
3.11	Charakterisierung der DC Subpopulationen aus der Peripherie, sowie den Darm- assoziierten lymphatischen Organen (GALT) .....	49
3.12	Untersuchung der naiven T-Zellpopulation in KO und WT Tieren.....	53
3.13	Analyse der Expression kostimulatorischer Moleküle von Makrophagen .....	55
3.14	Untersuchung der CD4 <sup>+</sup> Thymus T-Zellpopulation.....	56
3.15	Untersuchung, der Treg-induzierenden DCs im Thymus .....	57
3.16	Analyse des Zytokinprofils CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	59
3.17	Expressionsanalyse der Transkriptionsfaktoren T-bet und RORγt der CD4 <sup>+</sup> T- Zellen.....	61
3.18	Analyse der regulatorischen T-Zellpopulation .....	63
3.19	Orale Toleranz als <i>in vivo</i> Model .....	64
3.19.1	Orale Toleranz: Bestimmung der Fußschwellung als Maß der DTH.....	65
3.19.2	Orale Toleranz: Untersuchung der regulatorischen T-Zellpopulation .....	66
3.19.3	Orale Toleranz: Analyse der Th1- und Th17-Differenzierung in drainierenden Lymphknoten.....	67
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>71</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>79</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>82</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>88</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>90</b>



---

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Jedes Individuum steht zu jeder Zeit mit seiner Umwelt in intensivem Kontakt. Bei jedem Atemzug (BALT: bronchus associated lymphoid tissue), mit jeder Nahrungsaufnahme (GALT: gut associated lymphoid tissue) und mit jeder Verletzung unserer äußeren Schutzbarriere, der Haut, ist unser Körper dazu gezwungen, sich mit Fremdstoffen und Mikroorganismen auseinanderzusetzen. Im Falle pathogener Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien, muss der Körper in der Lage sein, diese unschädlich zu machen. Sollte dies nicht gelingen, wäre, im schlimmsten Falle, die Konsequenz der Tod eines Individuums. Da dies fatale Folgen für den Fortbestand der Art hätte, entwickelten sich, aus evolutionärer Sicht bereits sehr früh, erste Verteidigungsstrategien. So sind bereits Lebewesen von niedrigen Organisationsstufen wie Amöben in der Lage, Bakterien zu phagozytieren und durch Abbauprozesse unschädlich zu machen. Bemerkenswert dabei ist, dass Amöben hier zwischen Artgenossen und Fremdartigen unterscheiden können<sup>1</sup>. Diese Eigenschaft, zwischen „Selbst“ und „Fremd“ zu unterscheiden, zeichnet auch unser Immunsystem aus, welches sich im Verlauf der Evolution und mit der Entwicklung mehrzelliger Organismen immer weiterentwickelte. So verfügen sowohl Invertebraten (Wirbellose), als auch Vertebraten (Wirbeltiere) über ein angeborenes Immunsystem, bei dem der Abwehrmechanismus der Phagozytose auf spezialisierte Zellen übertragen wurde. Hierzu zählen die Makrophagen, sowie die Granulozyten<sup>1</sup>, die zusammen mit den Dendritischen Zellen (DCs) das mononukleäre Phagozyten-System darstellen und die zu phagozytierenden Mikroorganismen über Mustererkennungsrezeptoren (PRR: Pattern Recognition Receptors) erkennen. Diese PRRs sind Keimbahn-kodiert und erkennen konservierte Strukturen von Mikroorganismen (PAMPs: z.B. LPS), die für diese überlebenswichtig sind<sup>2</sup>. Dadurch ist gewährleistet, dass Mikroorganismen der Erkennung durch PRRs nicht durch ständige Veränderung/Mutation der PAMPs entkommen<sup>3</sup>.

---

<sup>1</sup> Granulozyten lassen sich in neutrophile-, eosinophile- und basophile Granulozyten unterteilen. Die neutrophilen Granulozyten bilden mit 50-70% den Hauptanteil der zirkulierenden Leukozyten und sind zusammen mit den Makrophagen die professionellen Phagozyten. Basophile Granulozyten (0,5-1% der Leukozyten) sind an der Regulation von Immunreaktion in den Schleimhäuten beteiligt (Atemwege und Magen-Darm-Trakt). Eosinophile Granulozyten sind für die Abwehr mehrzelliger, nicht phagozytierbarer Organismen von Bedeutung.

Eine Neuerung der evolutiv höher anzusiedelnden Vertebraten ist die Entwicklung eines adaptiven Immunsystems, zu dem die T-Lymphozyten sowie die B-Lymphozyten gehören. Die Rezeptoren dieser Zellen sind nicht mehr Keimbahn-kodiert, sondern entstehen durch somatische Rekombination. Hierdurch wird ein zufälliges Rezeptor-Repertoire mit einer Vielzahl an Rezeptorspezifitäten ausgebildet. Dies hat den Vorteil, dass theoretisch nahezu jedes Antigen erkannt werden kann und führt durch klonale Selektion der entsprechenden Lymphozyten zu einer Anpassung an die Umwelt und zu einer Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses<sup>4</sup>. Durch die zufällige Ausbildung der T- und B-Zellrezeptoren besteht jedoch auch die Gefahr, dass diese Rezeptoren körpereigene Strukturen erkennen. Somit muss die Entwicklung der T- und B-Zellen streng kontrolliert werden, um die Gefahr einer Autoimmunität gering zu halten. Für die T-Zellen findet sowohl die Entwicklung, als auch die Kontrolle des ausgebildeten Rezeptors im Thymus statt<sup>5</sup>, während sich die B-Zellen im Knochenmark entwickeln. Neben der Entwicklung der T- und B-Zellen wird auch deren Aktivierung und somit die Effektorfunktion dieser Zellen strikt kontrolliert. Eine wichtige Rolle in dieser Kontrolle, bzw. Lizenzierung, übernehmen DCs, indem sie die für eine T-Zellaktivierung benötigten Signale nur in Gegenwart von Pathogenen (danger-signals) bereitstellen. Zu diesen Signalen gehören das entsprechende Antigen, welches in Kombination mit körpereigenen Molekülen (MHC-Moleküle) präsentiert werden muss, sowie weitere kostimulatorische Signale, CD80 und CD86. Da die DCs zu dem angeborenen Immunsystem gezählt werden, stellen sie die Brücke zu dem adaptiven Immunsystem dar und sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

### **1.2 Dendritische Zellen als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort**

Obwohl bereits 1868 DCs, erstmals in der Haut von Paul Langerhans beschrieben wurden<sup>6</sup>, verging über ein Jahrhundert bis DCs 1973 von Ralph M. Steinman in der Milz wiederentdeckt wurden. Diese Entdeckung ermöglichte schließlich deren funktionelle Analyse. Steinman beschrieb eine neue Zellart, die sich aufgrund ihrer zahlreichen zytoplasmatischen Zellfortsätze von den restlichen Milzzellen unterschied und nannte sie auf Grund ihres Erscheinungsbildes DCs (griech. dendritisch = verästelt)<sup>7</sup>. Fünf Jahre nach ihrer Entdeckung konnte gezeigt werden, dass isolierte DCs, am Beispiel der MLR (mixed lymphocyte reaction) deutlich stärkere Immunstimulatoren sind, als zuvor verwendete Milzzellsuspensionen<sup>8</sup>. Diese Experimente belegten erstmals die Fähigkeit von DCs



---

Immunantworten zu initiieren. Heute werden DCs über die Expression der Oberflächenmoleküle MHC-II und CD11c charakterisiert.

Durch die Kombination mit weiteren Oberflächenmolekülen lassen sich DCs in eine Vielzahl von Subpopulationen unterteilen (siehe Tabelle 1), deren Hauptaufgabe jedoch darin besteht, Antigen in Kombination mit MHC-Molekülen auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, um so naive T-Zellen zu aktivieren. Darüber hinaus sind DCs in der Lage die Differenzierung naiver T-Zellen in verschiedene T-Helferzellen zu lenken (siehe Abbildung 1.1), wodurch sie entscheidend an der Kontrolle des adaptiven Immunsystems beteiligt sind.

### 1.2.1 Antigenaufnahme und DC-Reifung

Insbesondere konventionelle Dendritische Zellen (cDCs)<sup>2</sup>, die im gesamten Organismus verteilt vorliegen, sind darauf spezialisiert, Antigen (Pathogene) aufzunehmen und T-Zellantworten einzuleiten. In Abwesenheit von Pathogenen (danger-signals) befinden sich cDCs in einem als unreif beschriebenen Stadium. Dieses ist unter anderem dadurch gekennzeichnet, dass sie endozytotisch hoch aktiv sind. Mittels rezeptorvermittelter Endozytose<sup>9,10</sup> (Komplement-Rezeptoren, Mannose-Rezeptor, Fc-Rezeptoren, DEC-205), Makropinozytose<sup>11</sup> (unspezifische Flüssigphasen-Endozytose) oder durch direkte Phagozytose<sup>12</sup>, sind DCs in der Lage die Gewebe und Organe zu überwachen. Wird bei der Aufnahme von Antigen zusätzlich ein Gefahrensignal (z.B. LPS, CpG, doppelsträngige RNA; allgemein PAMPs), z.B. über die zu den PRR gehörenden Toll-like-Rezeptoren erkannt<sup>13</sup>, so beginnen DCs sich sowohl funktionell, als auch phänotypisch zu verändern. Dieser Vorgang wird als Reifung (DC maturation) bezeichnet. Hierbei verlieren DCs die Eigenschaft der Antigenaufnahme und sie beginnen das bereits aufgenommene Antigen zu prozessieren. Dabei wird das aufgenommene (exogene) Antigen im Phagolysosom in Peptide verschiedener Länge verdaut, welche dann von MHC-Klasse-II Molekülen gebunden werden können<sup>14</sup>. Diese Peptid-MHC-Klasse-II-Molekülkomplexe gelangen anschließend an die Zelloberfläche, wo sie von entsprechenden T-Zell-Rezeptoren erkannt werden können<sup>15</sup>. Die Antigenprozessierung erfolgt während DCs den Ort der Antigenaufnahme verlassen, um z.B. zu einem drainierenden Lymphknoten zu gelangen, welcher auch den Ort der T-Zellaktivierung darstellt. Ein weiteres Merkmal der DC-Reifung ist die verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle, wie z.B. CD40, CD80 und CD86, die neben dem T-Zellrezeptor

---

<sup>2</sup> Zu den cDCs gehören die „migratory DCs“, welche die peripheren Gewebe patrouillieren und nach Antigenaufnahme zu den Lymphknoten migrieren, so wie die „lymphoid-tissue-resident DCs“, welche permanent im gleichen Organ verbleiben und dort Antigen aufnehmen und präsentieren (z.B. Milz, Thymus).

über die Bindung an CD40-Ligand bzw. CD28 ein weiteres aktivierendes Signal übermitteln und so eine vollständige Aktivierung der T-Zellen gewährleisten<sup>16</sup>.

### 1.2.2 T-Zellaktivierung und Differenzierung von T-Helferzellen

Orte der T-Zellaktivierung sind die sekundären lymphatischen Organe, wie z.B. Lymphknoten oder die Milz, in denen reife DCs auf naive T-Zellen treffen. Für eine vollständige Aktivierung einer naiven T-Zelle sind 2 Signale notwendig. Zum einen muss eine T-Zelle den Antigen-MHC-Klasse-II-Molekülkomplex mit Hilfe des T-Zell-Rezeptors erkennen und zum anderen muss ein kostimulatorisches Signal (CD80, CD86) durch die DC gewährleistet sein, welches mit CD28 auf der T-Zelle interagiert<sup>16</sup>. Damit ein enger Zellkontakt zwischen DCs und der entsprechenden T-Zelle gewährleistet ist, exprimieren reife DCs eine Vielzahl von Adhäsionsmolekülen wie LFA-1, LFA-3, ICAM-1, ICAM-2<sup>17</sup> oder DC-SIGN. DCs sind jedoch nicht nur in der Lage naive T-Zellen zu aktivieren, sondern auch die Differenzierung naiver T-Zellen in verschiedene T-Helfersubpopulationen (Th1, Th2, Th9, Th17) zu bestimmen. Somit leiten DCs nicht nur eine adaptive Immunantwort ein, sondern bestimmen auch die Qualität einer nachfolgenden T-Zellantwort. Hierfür ist es entscheidend, von welcher DC-Subpopulation eine naive T-Zelle aktiviert wird und welche Zytokine von der entsprechenden DC sezerniert werden. Die zu den konventionellen DCs gehörenden „lymphoid-tissue-resident“ DCs lassen sich nochmals in  $CD8\alpha^+$ , sowie in  $CD8\alpha^-$  cDCs unterteilen und beide Subtypen unterscheiden sich in der Initiierung nachfolgender T-Zellantworten. So favorisieren z.B.  $CD8\alpha^+$  cDCs die Differenzierung naiver T-Zellen in T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1). Dies ist darauf zurückzuführen, dass diese Differenzierung in Abhängigkeit von IL-12 stattfindet und  $CD8\alpha^+$  cDCs die Hauptproduzenten dieses Zytokins sind<sup>18,19</sup>. In der naiven T-Zelle führt IL-12 in Kombination mit  $IFN-\gamma$  zu der Expression des Transkriptionsfaktors T-bet, welcher die Produktion von  $IFN-\gamma$  verstärkt und gleichzeitig die Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 (Differenzierung der Th2) unterdrückt. Eine nachfolgende Th1 Antwort ist somit durch das Leitzytokin  $IFN-\gamma$  sowie IL-2 charakterisiert. Im Gegensatz zu den  $CD8\alpha^+$  cDCs führen  $CD8\alpha^-$  cDCs primär zu einer Differenzierung der naiven T-Zellen in Th2<sup>19</sup>. Für diese Differenzierung ist vor allem das Zytokin IL-4 verantwortlich, wodurch der Transkriptionsfaktor GATA-3 induziert wird. GATA-3 kann nachfolgend die Produktion der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 induzieren, welche eine anschließende Th2 Antwort charakterisieren<sup>20,21</sup>.

Eine weitere DC-Subpopulation, die plasmazytoiden Dendritische Zellen (pDCs), sind durch eine schnelle Produktion von Interferonen in Reaktion auf eine Virusinfektion, charakterisiert<sup>22</sup>. Darüber hinaus können sie jedoch auch die Differenzierung von naiven T-Zellen, in Gegenwart von IL-6 und TGF- $\beta$  in Th17-Zellen einleiten<sup>23</sup>. Zusätzlich gibt es weitere DC-Subpopulationen, die mit der Differenzierung naiver T-Zellen in Th17-Zellen in Verbindung gebracht werden. So findet man im GALT eine DC-Population, welche als SIRP $\alpha^+$  CD103 $^-$  charakterisiert ist und deren Frequenz eindeutig mit der Ausbildung von Th17 Antworten korreliert<sup>24</sup>. Th17-Zellen können über den Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t und die Produktion des Zytokins IL-17<sup>25</sup> sowie IL-22 charakterisiert werden.

Neben den klassisch beschriebenen Th1- und Th2-Zellen sowie den Th17-Zellen gibt es eine weitere beschriebene T-Helferpopulation, die als Th9-Zellen bezeichnet werden. Ihre Effektorfunktion wird primär durch die Fähigkeit charakterisiert, große Mengen des Zytokins IL-9 zu produzieren<sup>26,27</sup>. Bisher wurden noch keine DC-Subpopulationen identifiziert, welche präferentiell die Differenzierung der Th9-Zellen induzieren. Es ist jedoch bekannt, dass die Differenzierung der Th9 Zellen in Gegenwart von IL-2, IL-4 und TGF- $\beta$  erfolgt und die Charakterisierung der Th9-Zellen durch die Expression der Transkriptionsfaktoren PU.1<sup>28</sup> und IRF-4 erfolgen kann. Eine Übersicht über die Th-Differenzierung ist in Abbildung 1.1, sowie in Tabelle 1 gegeben.

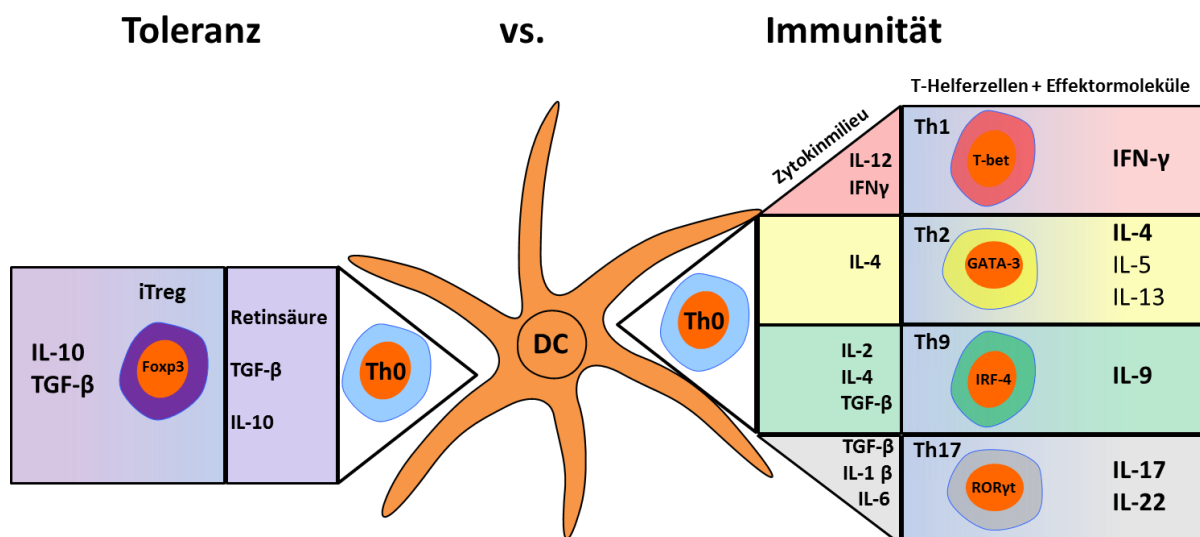


Abb. 1.1: T-Zelldifferenzierung in Gegenwart verschiedener Zytokinmilieus

### 1.2.3 Immunregulatorische Funktion der Dendritischen Zellen

DCs sind die stärksten Initiatoren adaptiver Immunantworten und können naive T-Zellen aktivieren und gleichzeitig deren Differenzierung in die verschiedensten Th-Zellpopulationen lenken. Darüber hinaus sind sie in der Lage, die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie zu kontrollieren und sind somit aktiv an der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz beteiligt. Dies gelingt z.B.  $CD8\alpha^+$  DCs, indem sie in Abwesenheit pathogener Stimuli das Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) sowie das anti-inflammatorische Zytokin TGF- $\beta$  produzieren. IDO baut die essentielle Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin ab, wodurch Tryptophan für T-Zellen nicht mehr zur Verfügung steht. Weiterhin kann Kynurenin in T-Zellen Apoptose induzieren<sup>29</sup>. Darüber hinaus können  $CD8\alpha^+$  DCs über die Produktion des immunsuppressiven Zytokins TGF- $\beta$   $Foxp3^- CD4^+$  T-Zellen in regulatorische  $Foxp3^+ CD4^+$  T-Zellen konvertieren<sup>30</sup> und somit die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz entscheidend beeinflussen. Besonders wichtig ist die Kontrolle der Immunantworten in den Darm-assoziierten-lymphatischen-Geweben (GALT: gut-associated lymphoid tissue). Das Immunsystem muss hier zwischen Pathogenen und kommensalen Bakterien unterscheiden sowie eine unangemessene Immunantwort gegen Antigene aus Nahrungsmitteln vermeiden. Ein Mechanismus, um Immunreaktionen gegen harmlose- oder Nahrungsantigene zu vermeiden, ist die Ausbildung der oralen Toleranz. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass unter anderem CD103-exprimierende CD11b positive DCs an der Induktion der oralen Toleranz entscheidend beteiligt sind<sup>31,32,33</sup>. Diese  $CD11b^+ CD103^+$  DCs können Antigene aus dem Darm aufnehmen und zu den mesenterialen Lymphknoten (drainierende Lymphknoten des Darms) transportieren<sup>34</sup>. Hier können diese DCs mit Hilfe des Enzyms Aldh1a1 die Bildung von Retinsäure (retinoic-acid) aus Vitamin A katalysieren. In Gegenwart von Retinsäure und TGF- $\beta$  können diese DCs zu einer verstärkten Bildung antigenspezifischer iTregs beitragen und so Immunantworten z.B. gegen harmlose Antigene vermeiden. Eine Übersicht der DC-Subpopulationen und deren präferentielle Th-Differenzierung kann aus Tabelle 1 gewonnen werden.

**Tabelle 1: DC-Subpopulationen**

Organ	DC-Subpopulation	Phänotyp	Funktion
Thymus	Sirp $\alpha^+$ DCs	CD11c $^+$ MHC-II $^+$ CD45RA $^-$ CD8 $\alpha^-$ Sirp $\alpha^+$	Induziert regulatorische T-Zellen (Tregs)
Milz	CD8 $^+$ DCs	CD11c $^+$ MHC-II $^+$ CD8 $^+$ CD205 $^+$ Sirp $\alpha^-$ CD11b $^-$	Th1-Differenzierung
Milz	CD8 $^-$ DCs	CD11c $^+$ MHC-II $^+$ CD8 $^-$ DCIR2 $^+$ SIRP $\alpha^+$ CD11b $^+$	Th2-Differenzierung
Darm (GALT)	migratory DCs	CD11c $^+$ MHC-II $^+$ CD11b $^+$ CD103 $^-$ CX3CR1 $^+$ M-CSFR $^{hi}$	Th1- /Th17-Differenzierung
mLN (GALT)	CD103 $^+$ DCs	CD11c $^+$ MHC-II $^+$ CD103 $^+$	Treg-Differenzierung
Milz	Plasmazytoide DCs	CD11c $^+$ MHC-II $^+$ PDCA-1 $^+$ CD45R $^+$	Th17-Differenzierung

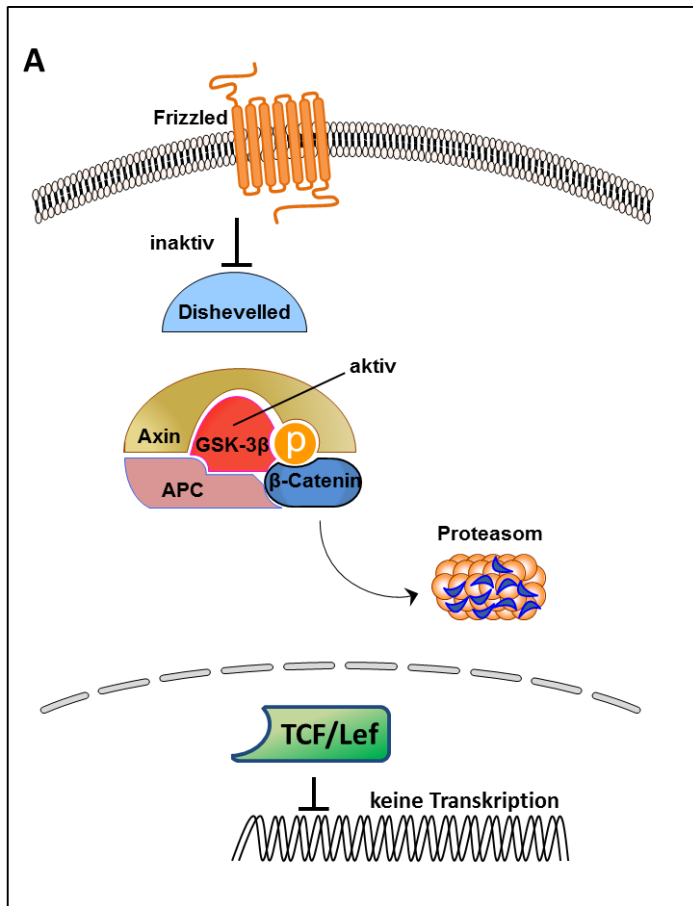
### 1.3 nTreg Kontrolle über Dendritische Zellen

Wie bereits beschreiben, birgt die zufällige Ausbildung des T-Zell-Rezeptor-Repertoires die Gefahr der Autoimmunität. Der Großteil der autoreaktiven T-Zellen wird bereits im Thymus im Zuge der klonalen Deletion eliminiert und stellt einen Prozess dar, der zur zentralen Toleranz führt<sup>35</sup>. Jedoch ist dieser Mechanismus nicht perfekt und T-Zellen mit einem autoreaktiven T-Zell-Rezeptor gelangen in die Peripherie, wo deren Aktivierung verhindert werden muss. Für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz sind insbesondere die natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen (nTregs) von zentraler Bedeutung. Diese können autoreaktive CD4 $^+$  und CD8 $^+$  T-Zellen effektiv in ihrer Aktivierung hemmen<sup>36,37</sup>. Eine deutlich effektivere Methode für nTregs zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz ist es jedoch, DCs zu supprimieren, welche dadurch einen tolerogenen Phänotyp zeigen und die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen nachfolgend verhindern. Dieser tolerogene Phänotyp ist unter anderem durch eine geringere Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 charakterisiert<sup>38</sup>. Werden T-Zellen in Abwesenheit dieser kostimulatorischen Signale über ihren T-Zellrezeptor aktiviert, resultiert dies in einem als Anergie bezeichneten Zustand. Dieser ist dadurch gekennzeichnet, dass die T-Zellen funktionell inaktiv sind. Hierzu

werden T-Zellrezeptor vermittelte Signale unterdrückt und die Expression des Zytokins IL-2, welches für die T-Zellproliferation essentiell ist, wird verhindert<sup>39</sup>.

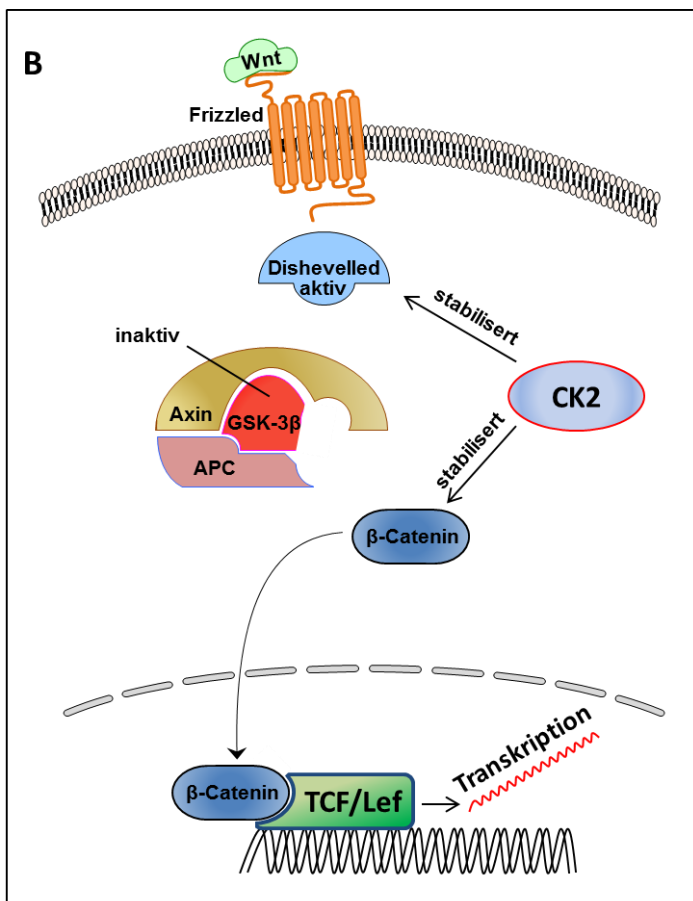
### 1.4 Casein Kinase 2

Die Casein Kinase 2 (CK2) gehört zu den Serin/Threonin Kinasen und liegt als Tetramer in den Zellen vor. Sie besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\alpha'$ , sowie aus 2 regulatorischen  $\beta$ -Untereinheiten, wobei die  $\beta$ -Untereinheiten für die Stabilität und Aktivität der CK2 verantwortlich zu sein scheinen<sup>40</sup>. Eine Besonderheit der CK2 ist, dass sie sowohl ATP, als auch GTP als Phosphatquelle nutzen kann<sup>41</sup>. Darüber hinaus gibt es mehr als 300 bekannte Substrate für CK2, darunter auch welche, die an dem Wnt-Signalweg beteiligt sind. Dieser spielt in DCs eine wichtige Rolle, z.B. in der Differenzierung der DCs aus Hämatopoetischen Stammzellen<sup>42</sup>. Die Aktivierung dieses Signalweges über den G-Protein gekoppelten Rezeptor Frizzled, führt zu einer Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin, indem CK2 dessen Phosphorylierung durch einen Proteinkomplex verhindert. Phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin wird im Zytosol abgebaut, während hypophosphoryliertes  $\beta$ -Catenin vor dem Abbau geschützt ist und daraufhin in den Zellkern gelangen kann. Hier kann  $\beta$ -Catenin nachfolgend mit den DNA-bindenden Proteinen TCF/Lef die Transkription verschiedener Gene induzieren<sup>43</sup>. Einen Überblick über diesen Signalweg soll Abbildung 2 geben. Insbesondere im Darm-assoziierten-lymphatischen-Gewebe (GALT) ist dieser Signalweg für die Aufrechterhaltung der Toleranz entscheidend. So sind DCs in Abwesenheit von  $\beta$ -Catenin nicht in der Lage, ausreichend anti-inflammatorische Faktoren wie z.B. Retinsäure (retinoic-acid), IL-10, oder TGF- $\beta$  zu bilden, um iTregs zu differenzieren. Dies hat zur Folge, dass im Darm die benötigte Toleranz nicht aufrechterhalten bleiben kann. Es bilden sich verstärkt T-Effektorzellen, insbesondere Th17 Zellen, welche in Autoimmunerkrankungen, wie z.B. IBD (inflammatory bowel disease) eine wesentliche Rolle spielen<sup>44</sup>.



**Abb. 1.2A: Inaktiver Wnt-Signalweg**

Ist der Wnt-Signalweg inaktiv, so wird  $\beta$ -Catenin durch einen Proteinkomplex, bestehend aus GSK-3 $\beta$ , Axin sowie APC phosphoryliert. Phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin wird daraufhin ubiquitinyliert und anschließend abgebaut. Somit kann  $\beta$ -Catenin nicht in den Zellkern gelangen, um hier eine TCF/Lef-abhängige Transkription einzuleiten.



**Abb. 1.2B: Aktive CK2**

Nach Aktivierung des Wnt-Signalweges kann CK2 den Abbau von  $\beta$ -Catenin verhindern, indem die Phosphorylierung durch den Proteinkomplex nicht mehr erfolgt.  $\beta$ -Catenin kann daraufhin in den Zellkern gelangen, um hier mit den Transkriptionsfaktoren TCF/ Lef zu interagieren, wodurch die Transkription von TCF/Lef-abhängigen Genen induziert wird.

### **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Schon lange stehen DCs im Fokus für Immuntherapien. So sollen z.B. DCs für das therapeutische Impfen gegen Krebs genutzt werden, um eine körpereigene Immunreaktion gegen bestehende Tumore einzuleiten. Auf der anderen Seite sind DCs auch in der Lage Toleranz aufrechtzuerhalten, so dass auch diese Eigenschaft ein lohnendes Ziel für Immuntherapien, z.B. gegen Autoimmunerkrankungen darstellt. Damit gezielte Manipulationen an DCs vorgenommen werden können, um sie therapeutisch zu nutzen, ist ein genaues Wissen ihrer Biologie absolute Voraussetzung. Die CK2 spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung von DCs und ist darüber hinaus an Signalwegen beteiligt, welche für die Aktivierung von DCs von großer Bedeutung sind<sup>42,44</sup>. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit mit Hilfe einer konditionellen Knock-out Maus die Rolle der CK2 in DCs untersucht werden. Insbesondere der Einfluss der CK2 auf die Aktivierung von DCs, als auch die Interaktion mit T-Zellen sollte in dieser Arbeit untersucht werden.



---

## 2. Material und Methode

### 2.1 Tiere

Für die Versuche dieser Arbeit wurden Mäuse folgender Stämme verwendet.

#### **C57/B16**

Durch Inzucht erhaltener, genetisch unveränderter Wildtyp-Stamm. Tiere des C57/B16 Stamms dienten in dieser Arbeit als Referenz-Tiere.

#### **OT-II**

Hierbei handelt es sich um einen transgenen Mausstamm auf einem Bl/6 Hintergrund. CD4<sup>+</sup> T-Zellen dieser Mäuse besitzen einen transgenen T-Zellrezeptor, spezifisch für eine Sequenz aus dem Ovalbumin (OVA Peptid 323-339).

#### **CD11c-cre x CK2b-fl/fl**

Durch Verpaarung von Tieren der Stämme CD11c-cre (Stammbezeichnung: B6.Cg-Tg(Itgax-cre)1-1Reiz/J)<sup>45</sup> und CK2b-fl/fl<sup>46</sup> wurde ein konditioneller Knock-out Stamm gezüchtet. In diesen Tieren findet der Knock-out für die  $\beta$ -Untereinheit der Casein-Kinase-2 unter der Kontrolle des CD11c-Promotors statt. Durch die Verwendung des CD11c-Promotors wurde ein Knock-out gezielt in DCs erreicht.

## 2.2 Das Cre/*loxP* Rekombinationssystem

Mit Hilfe des Cre/*loxP* Rekombinationssystems kann man gewebespezifisch, oder gezielt in einer einzigen Zellart einen Gen-Knock-out erzielen. Der Mechanismus hierbei beruht auf Rekombinationssignalsequenzen (*loxP*), welche einen bestimmten DNA-Bereich flankieren und einer Rekombinase (Cre) aus dem Bakteriophagen P1. Die Cre-Rekombinase erkennt die *loxP*-Signalsequenzen, schneidet die dazwischen liegende DNA heraus und verknüpft die beiden DNA-Enden wieder miteinander. Für einen gezielten Gen-Knock-out müssen zunächst die *loxP*-Signalsequenzen in das Genom eines Tieres integriert werden. Diese werden durch homologe Rekombination an den beiden Enden eines Zielgens eingeführt. Zusätzlich muss das Gen für die Cre-Rekombinase in das Genom des Tieres eingeführt werden. Stellt man die Expression der Cre-Rekombinase unter die Kontrolle eines zellspezifischen Promotors, so wird das Enzym nur in der Zelle von Interesse aktiv. Dadurch ist ein zellspezifischer Knock-out des *loxP*-flankierten Zielgens gewährleistet. In dieser Arbeit wurden Mäuse verpaart, die zum einen ein *loxP*-flankiertes Exon im Gen der  $\beta$ -Untereinheit der Casein Kinase 2 besitzen und zum anderen eine Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CD11c-Promotors besitzen. Dadurch wurde ein Knock-out der Casein Kinase 2 $\beta$  Untereinheit in CD11c<sup>+</sup> Zellen erreicht. Auf Grund des Fehlens der  $\beta$ -Untereinheit konnte sich keine funktionsfähige Casein Kinase 2 bilden. CD11c ist ein anerkannter Zellmarker für DCs, so dass die hier verwendete **CD11c-cre x CK2 $\beta$ <sup>f/f</sup>** Maus geeignet ist, um die Rolle der Casein Kinase 2 in DCs zu studieren.

### 2.2.1 Genotypisierung der CD11c-cre x CK2 $\beta$ <sup>f/f</sup> Mäuse

Die Mäuse wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des geflochtenen *ck2 $\beta$* -Gens sowie auf das Vorhandensein der Cre-Rekombinase untersucht. Für die Gewinnung der DNA wurde den zu untersuchenden Mäusen mit einem Skalpell ein geringer Teil der Schwanzspitze abgetrennt. Dieser wurde in 20 $\mu$ l Genomic-Lysis-Buffer + 0,5 $\mu$ l Proteinase K (Stocklsg. 20mg/ml) bei 55°C über Nacht verdaut. Nach Zugabe von 480 $\mu$ l H<sub>2</sub>O wurde die Proteinase K für 10min. bei 95°C inaktiviert. Die so gewonnene DNA diente als Matrize für eine Genotypisierungs-PCR.

Proteinase K wurde von der Firma Serva Electrophoresis GmbH bezogen.

Folgende Primer wurden für die Genotypisierung verwendet:

- CD11c-cre for.: 5'- ACT TGG CAG CTG TCT CCA AG - 3'
- CD11c-cre rev.: 5'- GCG AAC ATC TTC AGG TTC TG - 3'
- CK2 $\beta$ -fl for.: 5'- CTA GCT CGA GAT GAG TAG CTC TGA GGA GGT G - 3'
- CK2 $\beta$ -fl rev.: 5'-GGA TAG CAA ACT CTC TGA G - 3'

Die PCR wurde mit folgendem Ansatz und mit den angegebenen PCR-Programmen durchgeführt:

**PCR-Ansatz:**

Reagenzien	Volumen ( $\mu$ l)
10x Puffer	2,5
dNTP's (10mM)	0,5
Primer (for. + rev.[5pmol])	1
H <sub>2</sub> O	17,875
DNA (Probe)	3
Polymerase (Dream-Taq)	0,125
$\Sigma$	25

**PCR-Programm CD11c-cre:**

Schritt	Temperatur	Zeit (min.)	Wiederholung
1. Initiale Denaturierung	94°C	5	
2. Denaturierung	94°C	0,5	
3. Annealing	63°C	0,5	
4. Elongation	72°C	1	Zu Schritt 2 (29x)
5. Finale Elongation	72°C	3	

**PCR-Programm CK2 $\beta$ -fl:**

Schritt	Temperatur	Zeit (min.)	Wiederholung
1. Initiale Denaturierung	94°C	5	
2. Denaturierung	94°C	0,5	
3. Annealing	55°C	0,5	
4. Elongation	72°C	2	Zu Schritt 2 (40x)
5. Finale Elongation	72°C	8	

### 2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in dieser Arbeit für die Auswertung der Genotypisierungs-PCR verwendet. Dazu wurden 20µl des PCR-Produkts auf ein 1,5%iges Agarosegel (1,5g Agarose/100ml TBE-Puffer) aufgetragen. Zusätzlich wurden, um das Amplifikat sichtbar zu machen, 2µl Ethidiumbromid pro 100ml Agarosegel zugegeben. Die Gelelektrophorese wurde bei 100V und 500mA für ca. 30min. durchgeführt. Um die Größe des Amplifikats zu bestimmen, wurde jeweils ein 100bp DNA-Marker aufgetragen. Zusätzlich wurden, als positiv und negativ Kontrollen, von WT bzw. CD11c-cre und CK2β-fl/fl positiven Mäusen Proben aufgetragen. Die Auswertung der Agarose-Gelelektrophorese erfolgte unter UV-Licht.

Verwendet wurde Agarose NEEO Ultra-Qualität der Firma Carl Roth GmbH.

Folgende PCR-Produkte sind bei der Genotypisierung zu erwarten:

<b>Probe</b>	<b>pos. Kontrolle</b>	<b>neg. Kontrolle</b>
CD11c-cre	<b>300 bp</b>	<b>kein Amplikon</b>
CK2β-fl	<b>550 bp</b>	<b>450 bp</b>

---

## 2.4 Zellkultur: Isolation und Kulturbedingungen

### 2.4.1 Differenzierung von Dendritischen Zellen aus dem Knochenmark

- Tötung der Tiere mittels CO<sub>2</sub> (Überprüfung des Lidschlussreflexes)
- Sterilisation der Tiere mit Isopropanol (Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgen steril)
- Abtrennen der Hinterläufe und Präparation von Femur (Oberschenkel) und Tibia (Schienbein)
- Reinigung der Knochen mit Hilfe von Mullkompressen (getränkt mit 70% Ethanol) und anschließende Eröffnung der Knochen durch einen Schnitt an den jeweiligen Knochenenden
- Ausspülen der Knochen mit PBS + 10% FCS (10ml Spritze, 24G 0,55 x 25mm Kanüle) und auffangen des Knochenmarks in einer Petrischale
- Gründliches resuspendieren des Knochenmarks zur Herstellung einer Zellsuspension
- Überführung der Zellsuspension in ein 50ml Falcon, Zentrifugation (RT) bei 700g für 5min.
- Lyse der Erythrozyten, mittels osmotischen Schocks: Dazu Zellpellet in 1ml Gey's Lysepuffer resuspendieren und 1min. bei RT inkubieren.
- Abstoppen der Lyse durch Zugabe von 10ml PBS. Die Zellsuspension über ein Zellsieb (40µm) in ein neues Falcon überführen. Zentrifugation (RT) bei 700g für 5min.
- Zellen in DC-Differenzierungsmedium (TM + 5%FCS + 2% GM-CSF) aufnehmen und auf 3x10<sup>6</sup> Zellen/ml einstellen
- Die Zelldifferenzierung erfolgt in einer 6-Well-Platte in einem Gesamtvolumen von 4ml für 6 Tage, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>
- **Tag 2 der Zelldifferenzierung:** Zellsuspension vorsichtig resuspendieren und 3ml Medium entnehmen und durch 3ml frisches DC-Differenzierungsmedium ersetzen.
- **Tag 4 der Zelldifferenzierung:** 3ml Medium entnehmen und durch 3ml frisches DC-Differenzierungsmedium ersetzen.
- **Tag 6 der Zelldifferenzierung:** unreife DCs sind nicht-, bzw. semi-adhären und können durch vorsichtiges resuspendieren geerntet werden.

## 2.4.2 MACS: Isolation von T-Zellen aus der Milz

### 2.4.2.1 Herstellung einer Zellsuspension aus der Milz:

CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus der Milz mittels MACS-Technologie isoliert. Nach Tötung der Tiere durch CO<sub>2</sub>-Begasung wurden die Milzen steril entnommen und mit Hilfe eines Zellsiebes in MEM + 2% FCS zu einer Zellsuspension zerrieben. Zur Lyse der Erythrozyten, mittels osmotischen Schocks, wurden die Zellen in Gey's Lysepuffer (1 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml) resuspendiert und 1min. bei RT inkubiert. Mit einem Überschuss MEM + 2% FCS wurde die Erylyse abgestoppt und die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (40µm) in ein neues Falcon überführt. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen auf 1 x 10<sup>8</sup>/ml in GM-Puffer eingestellt.

### 2.4.2.2 Depletion CD25<sup>+</sup> T-Zellen:

Für die nachfolgenden Versuche war es wichtig eine CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation, frei von regulatorischen T-Zellen (Tregs) zu verwenden. Aus diesem Grund wurden vor der CD4<sup>+</sup> T-Zellgewinnung alle CD25<sup>+</sup> Zellen aus der Zellsuspension entfernt. CD25 ist die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors, welche konstitutiv von regulatorischen T-Zellen exprimiert wird<sup>47</sup>, nicht aber von naiven konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen, so dass dies eine Möglichkeit zur Depletion der Tregs darstellt. Folgendes Protokoll wurde für die Treg-Depletion verwendet:

- Inkubation der Milzzellen mit einem biotinylierten  $\alpha$ -CD25 Antikörper (0,5µg/ml) für 15min. bei 4°C
- Zweimaliges waschen der Zellen mit GM-Puffer
- Einstellen der Zellen auf 1 x 10<sup>8</sup> /ml in GM-Puffer
- Inkubation der Zellen (auf 1 x10<sup>8</sup> /ml eingestellt) mit SA-Beads (1/40) für 20min. bei 4°C
- Volumen auf 5ml auffüllen (max. 5 x 10<sup>8</sup> Zellen/ LS-MACS Säule) und die Zellen in 1ml Schritten über eine LS-MACS Säule geben
- Ausspülen des Falcons mit 2ml GM-Puffer und diese auf die LS-MACS Säule geben
- Nachdem die gesamte Zellsuspension über die Säule gegeben wurde, diese 2x mit 3ml GM-Puffer spülen

- 
- Der Durchlauf (CD25-depletierte Zellfraktion) wurde für die weitere Aufreinigung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen verwendet

#### 2.4.2.3 Positiv Selektion der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen:

- Zellzahlbestimmung des Durchflusses und Zellen auf  $1 \times 10^8$ /ml in GM-Puffer einstellen
- Inkubation der Zellen mit einem biotinylierten  $\alpha$ -CD4 Antikörper (0,5 $\mu$ g/ml) für 15min. bei 4°C
- Zweimaliges waschen der Zellen mit GM-Puffer
- Inkubation der Zellen mit SA-Beads (1/40) für 20min. bei 4°C
- Volumen auf 5ml auffüllen und die Zellen in 1ml Schritten über eine LS-Säule (MACS-Stand) geben
- Zweimaliges waschen der LS-Säulen mit je 3ml GM-Puffer
- LS-Säule aus dem Magnetfeld entnehmen und die positiv selektionierten Zellen mit 5ml GM-Puffer eluieren
- MACS-Vorgang wiederholen
- Nach dem zweiten MACS-Durchlauf können die CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in die entsprechenden Versuche eingesetzt werden.

#### 2.4.2.4 Positiv Selektion der CD25<sup>+</sup> natürlich vorkommender regulatorischer T-Zellen:

- Milzzellsuspension auf  $1 \times 10^8$  /ml in GM-Puffer einstellen
- Inkubation der Zellen mit 0,5 $\mu$ g/ml biotinylierten  $\alpha$ -CD25-Antikörper für 20min bei 4°C
- Zweimaliges waschen der Zellen mit GM-Puffer
- Einstellen der Zellen auf  $1 \times 10^8$ / ml GM-Puffer und Inkubation mit 1/400 SA-PE, für 15min. bei 4°C
- Zweimaliges waschen der Zellen mit GM-Puffer
- Zellen in 1ml GM-Puffer resuspendieren und mit 10 $\mu$ l/  $1 \times 10^8$  Zellen  $\alpha$ -PE-Beads, für 10min. bei 4°C inkubieren. Anschließend 10min. Inkubation bei RT auf einem Rüttler

- Volumen mit GM-Puffer auf 5ml auffüllen und Zellen in 1ml Schritten über die Säule geben, Falcon mit 2mlGM-Puffer ausspülen und ebenfalls über die Säule geben
- MACS-Säule zweimal mit 3ml GM-Puffer waschen
- Zellen mit 5ml GM-Puffer eluieren
- Zellen in 1ml PBS + 0,5% BSA aufnehmen und mit  $\alpha$ -MAC1,  $\alpha$ -CD8, sowie mit  $\alpha$ -B220 Dynabeads inkubieren, um verbliebene Zellverunreinigungen zu entfernen. Inkubation erfolgt bei RT für 20min. auf einem Rüttler.  
Folgende Berechnung liegt der Dynabead-Behandlung zu Grunde:  
Zellzahl: Hiervon 30% Verunreinigung, wovon 50% auf B-Zellen entfallen. Diese Zellzahl x8 (Bedeutet 8-fache Menge an  $\alpha$ -B220 Dynabeads; 8 Beads/ Zelle).  $\alpha$ -CD8- und  $\alpha$ -MAC1-Beads mit jeweils der Hälfte des Volumens der  $\alpha$ -B220 Beads inkubieren.
- Nach erfolgter Inkubation auffüllen der Zellsuspension mit PBS + 10% FCS auf 5ml und einstellen des Falcons in einen Magneten
- Vorsichtiges überführen des Überstandes mit einer Pasteurpipette in ein neues Falcon
- Mit 5ml PBS + 10% FCS die Dynabeads resuspendieren und das Falcon erneut in den Magneten stellen
- Den Überstand erneut vorsichtig überführen; Zellen abzentrifugieren und in Treg-Medium aufnehmen
- Zellzahlbestimmung

### 2.4.2.5 Vorbereitungen der LS-MACS Säulen:

- Säulen 2x mit 1xPBS + Tween20 (1/1000) spülen
- Säulen 2x mit 1xPBS spülen
- Säulen 2x mit Isopropanol spülen
- Säulen in die Magnethalterung einfügen und mit 3ml 1xPBS + 0,5% BSA spülen

Die Säulen für die Zellisolation wurden von Miltenyi Biotec bezogen.



---

**2.4.2.6 Zur Zellaufreinigung verwendete Antikörper und Miltenyi - MicroBeads**

<b>Spezifität</b>	<b>Klon</b>	<b>Modifikation</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>CD25</b>	<b>PC61</b>	<b>Biotin</b>	<b>eigene Herstellung</b>
<b>CD25</b>	<b>7D4</b>	<b>Biotin</b>	<b>eigene Herstellung</b>
<b>CD4</b>	<b>H129.19</b>	<b>Biotin</b>	<b>eigene Herstellung</b>
<b>B220</b>		<b>Beads</b>	<b>Miltenyi Biotec</b>
<b>MAC1</b>		<b>Beads</b>	<b>eigene Herstellung</b>
<b>CD8</b>		<b>Beads</b>	<b>Miltenyi Biotec</b>
<b>Biotin</b>		<b>PE</b>	<b>Dianova</b>
<b>Biotin</b>		<b>Streptavidin</b>	<b>Miltenyi Biotec</b>
<b><math>\alpha</math>-PE</b>		<b>Beads</b>	<b>Miltenyi Biotec</b>

### 2.4.3 Aktivierung der Tregs und Suppressionsassay

Für einen Suppressionsassay wurden in dieser Arbeit natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen (nTregs) aus der Milz verwendet. Nach der Isolation der Tregs wurden diese zunächst in Treg-Medium (TM5%FCS + 100ng/ml IL-2) aufgenommen und mittels  $\alpha$ -CD3 (3 $\mu$ g/ml) und  $\alpha$ -CD28 (3mg/ml) für 3 Tage aktiviert. An Tag 3 wurden die Zellen geerntet und 1:3 mit Treg-Medium verdünnt und für weitere 2 Tage, ohne weiteren Stimulus kultiviert. An Tag 5 wurde die Zellzahl bestimmt und die Tregs in den entsprechenden Versuch eingesetzt.

Zur Suppression der DCs wurden 2 x 10<sup>5</sup> DCs in einem 1:3 Verhältnis, also 6 x 10<sup>5</sup> Tregs kultiviert. Die Kultur erfolgte in einer 96-Well-Rundbodenplatte in einem Gesamtvolumen von 200 $\mu$ l, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 16h. Für die Aktivierung der DCs wurde der TLR4-Ligand LPS in einer Konzentration von 100ng/ml in die Kultur gegeben. Die Aktivierung der Tregs erfolgte polyklonal mittels  $\alpha$ CD3 (3 $\mu$ g/ml).

### 2.4.4 CFSE-Markierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die Färbung von Zellen mit CFSE (Sigma Aldrich) ist eine einfache Methode, um das Proliferationsverhalten von Zellen zu untersuchen. CFSE kann die Zellmembran passieren und so in die Zelle gelangen. Intrazellulär werden die Acetatgruppen durch Esterasen abgespalten, wodurch CFSE nicht mehr die Membran passieren kann und zusätzlich zu Fluoreszenz befähigt ist. Bei jeder Zellteilung wird CFSE zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben, wodurch die Proliferation und die Anzahl der Teilungsschritte einer Zellpopulation im Durchflusszytometer, an Hand der CFSE-Intensität, verfolgt werden kann.

#### Durchführung der Zellmarkierung:

- Zellen zweimal mit PBS waschen und anschließend die Zellzahl bestimmen
- Zellen in PBS auf 1 x 10<sup>7</sup> /ml einstellen
- CFSE (Stocklösung 10mM) auf 2 $\mu$ M einstellen und 1:1 mit den Zellen mischen
- Inkubation für 4min. 37°C und 5% CO<sub>2</sub> (Brutschrank)
- Abstoppen der Reaktion mit TM10% FCS
- Zweimaliges waschen der Zellen mit TM10% FCS
- Einmal waschen mit TM5% FCS
- Bestimmung der Zellzahl und einsetzen der Zellen in den jeweilige Versuch

---

#### **2.4.5 Gewinnung von Dendritischen Zellen durch enzymatischen Organauflschluss**

Zur Isolation Dendritischer Zellen aus Lymphknoten und Milz wurden diese Organe enzymatische mit Hilfe von DNase-I und Kollagenase-II verdaut. Die Organe wurden steril entnommen und in 4ml TM + 5%FCS in einer 6-Well-Platte überführt. Zu dem TM + 5%FCS wurden DNase-I (0,1mg/ml), sowie Kollagenase-II (1mg/ml) zugegeben. Mit Hilfe einer 1ml Spritze (Kanüle: 24G 0,55 x 25mm) wurde das Verdauungsmedium in die Organe injiziert und für 25min. im Brutschrank (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) inkubiert. Im Anschluss wurden die Organe mechanisch, mit Pinzette und Kanüle, zerkleinert und für weitere 25min. im Brutschrank inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion und zur Minimierung der Zelladhäsion wurde EDTA (10mM) zugegeben und für weitere 5min. im Brutschrank inkubiert. Nach dem Verdau sollten die Organe vollständig verdaut und als Zellsuspension vorliegen. Um letzte Bindegewebsreste aus der Zellsuspension zu entfernen, wurde diese über ein Zellsieb (40µm) in ein 50ml Falcon überführt. Die Zellen standen nach einmaligem Waschen mit TM + 5%FCS für die jeweiligen Versuche zur Verfügung.

#### **2.4.6 Gewinnung von Makrophagen**

In dieser Arbeit verwendete Makrophagen wurden mittels peritonealer Lavage (Spülung der Bauchhöhle) gewonnen. Hierfür wurden Mäuse durch CO<sub>2</sub>-Begasung abgetötet und mit Isopropanol sterilisiert. Die Spülung der Bauchhöhle erfolgte durch Injektion von 6-10ml sterilem PBS, welches anschließend wieder mit einer 10ml Spritze (Kanüle: 24G 0,55 x 25mm) aus der Bauchhöhle abgezogen wurde. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in TM + 5%FCS aufgenommen. Nach der Zellzahlbestimmung standen die Zellen für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

#### **2.4.7 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wird eine Verdünnung der Zellen in Trypanblau hergestellt. Trypanblau ist ein Farbstoff, welcher in tote Zellen, jedoch nicht in lebende Zellen eindringen kann und so zur Bestimmung der Lebendzellzahl verwendet wird. Nach Auszählung der Zellen (4 Großquadrate) in einer Neubauerzählkammer wird die Gesamtzellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl: Zellzahl} \times \text{Verdünnung} \times \text{Volumen (ml)} \times \text{Kammerfaktor} (10^4)$$

#### **2.4.8 Stimulation von BMDCs in An- & Abwesenheit des CK2 Inhibitors DMAT**

Unreife BMDCs wurden an Tag 6 der Zelldifferenzierung geerntet. Nach Bestimmung der Zellzahl, wurden die Zellen auf  $1 \times 10^6/\text{ml}$  in TM + 5% FCS eingestellt. 200 $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden in eine 96-Well-Rundbodenplatte überführt, was einer Zellzahl von  $2 \times 10^5$ /Ansatz entsprach. Um BMDCs zu stimulieren wurde LPS (TLR4-Ligand) in einer Konzentration von 100ng/ml zugegeben. Der CK2 Inhibitor, DMAT, wurde in einer Konzentration von 4 $\mu\text{M}$  sowohl zu den stimulierten, als auch zu den unstimulierten Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 16h, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die BMDCs auf die Expression kostimulatorischer Moleküle (CD40, CD80, CD86) untersucht.

#### **2.4.9 Stimulation mit Ionomycin und PMA**

T-Zellen lassen sich leicht durch das Calciumionophor Ionomycin stimulieren. Die Kombination mit dem Phorbolster PMA führt zu einer maximalen Aktivierung der Zelle durch Aktivierung der Ca<sup>2+</sup> abhängigen Transkriptionsfaktoren, NFAT und NF $\kappa$ B, wodurch diese zur Zytokinproduktion angeregt werden<sup>48</sup>. In dieser Arbeit wurden  $2 \times 10^5$  der jeweiligen Zellen in 96-Well-Rundbodenplatten, in einem Volumen von 200 $\mu\text{l}$  TM5%FCS, mit folgenden Konzentrationen stimuliert:

Ionomycin: 1 $\mu\text{M}$

PMA: 20ng/ml

Damit sich die nachzuweisenden Zytokine in der Zelle anreichern, erfolgten die letzten 4h der Stimulation in Gegenwart von BrefeldinA, welches die Sekretion von Proteinen aus der Zelle verhindert<sup>49</sup>.

---

## 2.5 Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA)

Der ELISA dient dem Nachweis und der Quantifizierung von Proteinen, wie z.B. Zytokinen. In dieser Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA, spezifisch für das Zytokin IL-6 und IFN- $\gamma$  durchgeführt. Hierbei wurden spezielle ELISA-Platten (96-Well-Platten) mit einem primären Antikörper beschichtet. Dieser bindet spezifisch das Protein von Interesse (hier IL-6, IFN- $\gamma$ ) aus den aufgetragenen Proben (Kulturüberstand). Die Detektion des gesuchten Proteins erfolgt über einen zweiten, biotinylierten Antikörper. An diesen kann, an Streptavidin gekoppelt, das Enzym Meerrettichperoxidase binden. Durch Zugabe des Substrats ABTS (Sigma Aldrich), in Gegenwart von Wasserstoffperoxid, erfolgt ein Farbumschlag. Die Auswertung erfolgte photometrisch, durch Verwendung eines Filters der Wellenlänge 410nm. Durch die Verwendung eines Standards, bekannter Konzentration, konnte die Konzentration der Zytokine in den Proben bestimmt werden.

### Durchführung:

- Beschichten der ELISA-Platten mit dem primären Antikörper in 50 $\mu$ l Binde-Puffer (über Nacht bei 4°C)
- Waschen der ELISA-Platten mit Wasch-Puffer
- Blockieren der freien Bindstellen mit Block-Puffer (50 $\mu$ l/ Well), für 30min. und 37°C
- Auftragen und titrieren der Proben: 50 $\mu$ l der Probe zu den 50 $\mu$ l Block-Puffer gegeben, resuspendieren und 50 $\mu$ l in das nächste Well überführen (serielle 1:2 Verdünnung), Inkubation für 1h, bei 37°C
- Waschen
- Detektion: Zugabe des sekundären Antikörpers in 50 $\mu$ l Block-Puffer, Inkubation für 1h, bei 37°C
- Waschen
- Zugabe von Streptavidin-Meerrettichperoxidase (1/1000) in 50 $\mu$ l Block-Puffer, Inkubation für 1h, bei 37°C
- Waschen
- 50 $\mu$ l Substratlösung hinzufügen: ABTS gelöst in Citrat-Puffer (1mg/ml) + 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:4000), Inkubation für 15min. bei RT
- Messung der Adsorption bei 410nm

Spezifität	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
Interleukin-6	BD Pharmingen Cat.: 55440 0,5µg/ml eingesetzt	BD Pharmingen Cat.: 554402 biotinyliert 0,5µg/ml eingesetzt
Interferon-γ	R46A2: 4µg/ml eingesetzt	AN18.17.24 biotinyliert: 0,45µg/ml eingesetzt

## 2.6 RNA-Isolation und reverse Transkription

Zur Isolation der gesamt RNA aus Zellen wurde in dieser Arbeit TRIzol der Firma Invitrogen verwendet, welches den direkten Zellaufschluss und die Inhibition von RNasen gewährleistet. Die RNA-Isolation erfolgt in 3 Schritten: RNA-Extraktion, RNA-Präzipitation, sowie waschen der RNA.

- min.  $1 \times 10^5$  bis max.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in 1ml TRIzol aufgenommen, resuspendiert und in ein 1,5ml Eppi überführt
- zu der Probe wurden 200µl Chloroform (Carl Roth GmbH) gegeben, gevortext und anschließend 5 min. bei RT inkubiert
- Zentrifugation bei 4°C, 11.500rpm (Tischzentrifuge), 15min.
- Nach der Zentrifugation bilden sich eine obere wässrige Phase, eine Interphase, sowie eine untere organische Phase aus. Die obere Phase (ca. 500µl) wird abgenommen und in ein neues 1,5ml Eppi überführt
- Zugabe von 1,5µl Glykogen (0,2M), invertieren der Probe und Inkubation bei RT für 5min.
- Zentrifugation bei 4°C, 11.500rpm, 10min.
- Überstand verwerfen
- Zugabe von 1ml 75%igen Ethanol (in DEPC-Wasser)
- Zentrifugation für 5min. bei 9200rpm
- Waschschrift wiederholen
- Überstand verwerfen und Pellet trocknen lassen
- Pellet in 20µl DEPC-Wasser lösen

Die reverse Transkription dient dem Umschreiben der RNA in eine cDNA (complementary DNA) und beruht auf dem viralen Enzym, reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase). In dieser Arbeit wurde die RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase von Thermo Scientific verwendet. Die so gewonnene cDNA diente anschließend als Template für Genexpressionsanalysen, mittels quantitativer-PCR (qRT-PCR). Folgender Ansatz wurde für die reverse Transkription verwendet:

Reagenzien	Volumen (µl)
5x RT-Buffer	4
dNTP's (10nM)	2
Random-N6-Primer	1
Oligo-dT-Primer	1
M-MLV reverse Transkriptase	1
H <sub>2</sub> O	add. 20µl
+ RNA (Probe)	300ng
<b>Σ</b>	<b>20</b>

Die Reaktion erfolgte für 1h bei 42°C.

## 2.7 Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die Methode der Real-Time-PCR hat der konventionellen PCR gegenüber den Vorteil, dass das zu amplifizierende Gen von Interesse quantifiziert werden kann. Dies wird durch den Einsatz von fluoreszierenden Molekülen, wie SYBR-Green, erreicht. SYBR Green bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA und ist daraufhin zu starker Fluoreszenz befähigt. Das bedeutet, die Menge an DNA in einer Probe ist proportional zur zunehmenden Fluoreszenz. Diese Methode eignet sich daher, um vergleichende Genexpressionsanalysen durchzuführen. In dieser Arbeit wurde der SYBR Green ER qPCR SuperMix der Firma Invitrogen verwendet, in welchem alle notwendigen Reagenzien (dNTP's, Polymerase, entsprechende Puffer) zur Durchführung einer PCR enthalten sind. Zugegeben werden die genspezifischen Primer (forward + reverse) sowie die zu analysierende cDNA zu folgendem Ansatz:

Reagenzien	Volumen (µl)
SYBR-Green Mix	40
cDNA	8
Primer (for. + rev.) 5pmol	3,2
H <sub>2</sub> O	28,8
<b>Σ</b>	<b>80</b>

Dieser Ansatz ist für die Messung von Triplikaten ausgelegt. Gemessen wurden die Proben in einem BioRAD MyIQ iCycler unter Verwendung folgenden PCR-Programms:

Schritt	Temperatur	Zeit (min.)	Wiederholung
<b>1. Initiale Denaturierung</b>	<b>95°C</b>	<b>15</b>	
<b>2. Denaturierung</b>	<b>95°C</b>	<b>0,5</b>	
<b>3. Annealing</b>	<b>57°C</b>	<b>0,5</b>	
<b>4. Elongation</b>	<b>72°C</b>	<b>1</b>	<b>Zu Schritt 2 (50x)</b>
<b>5. Finale Denaturierung</b>	<b>95°</b>	<b>1</b>	
<b>6. Schmelzkurvenbestimmung</b>	<b>95°C – 65°C</b>	<b>0,1</b>	<b>60x</b>



## 2.7.1 Verwendete Oligonucleotide:

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
IL-1 $\beta$ for.	5'- TCA GGC AGG CAG TAT CAC TC - 3'
IL-1 $\beta$ rev.	5'- TCA TAT GGG TCC GAC AGC AC - 3'
IL-6 for.	5'- GCC AGA GTC CTT CAG AGA GAT AC - 3'
IL-6 rev.	5'- CCC AAC GAT TCA TAT TGT CAG - 3'
Aldh1a1 for.	5'- ATG GTT TAG CAG CAG GAC TAT TC - 3'
Aldh1a1 rev.	5'- CCA GAC ATC TTG AAT CCA CCG AA - 3'
HGPRT for.	5'- GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G - 3'
HGPRT rev.	5'- GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG CT - 3'

## **2.8 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)**

Anhand ihrer Größe, Granularität und der Expression verschiedener Oberflächenproteine können Zellen voneinander unterschieden werden. Um Zellen, z.B. in einer Kokultur, nach diesen Kriterien zu analysieren, kann man sich der Durchflusszytometrie bedienen. Um die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf Zellen sichtbar zu machen, werden die Zellen zunächst mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Antikörper sind mit Fluorophoren markiert, welche im Durchflusszytometer detektiert werden können.

Bei der Analyse im Durchflusszytometer passieren die Zellen eine Kapillare und werden einzeln von einem Laser erfasst. Hierbei verursachen die Zellen eine Lichtstreuung, wodurch sowohl die Größe, als auch die Granularität der Zelle bestimmt werden kann. Die Größe der Zellen lässt sich durch das Vorwärtsstreulicht FSC (Forward Scatter) ableiten. Das Vorwärtsstreulicht wird durch Beugung des Lichts durch die Zellen hervorgerufen. Die Granularität der Zellen wird mit Hilfe des Seitwärtsstreulicht SSC (Side Scatter) gemessen. Das Seitwärtsstreulicht entsteht durch Brechung des Lichts durch die Zellen. Zusätzlich kann die Fluoreszenz der an die Antikörper gebundenen Fluorophore gemessen werden und somit eine Aussage über das Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen der Zellen getroffen werden.

Für diese Arbeit wurde ein Gerät der Firma BD mit der Bezeichnung ARIA-II verwendet. Die Auswertung erfolgte im BD eigenen Programm: FACS-Diva.

---

### 2.8.1 Durchführung der FACS-Färbung

- Zellen von Interesse mit 1x PBS waschen, abzentrifugieren und Überstand verwerfen
- **Färben der Zelloberfläche:**  $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  Zellen in 50 - 100µl Antikörperlösung (Antikörper je nach Interesse), bei 4°C für 15min inkubieren
- Zellen 2 x mit GM-Puffer waschen
- **Intrazelluläre Färbung:** Sollten intrazellulär Zytokine nachgewiesen werden, so wurden Zellen 4-5h vor der FACS-Färbung mit BrefeldinA (Sigma Aldrich) behandelt. BrefeldinA verhindert die Sekretion von Proteinen, welche sich daraufhin in der Zelle akkumulieren<sup>49</sup> und so in FACS-Analysen nachweisbar sind.
- Zellen in 100µl FixPerm (eBioscience) resuspendieren und für min. ½h - max. 16h bei 4°C inkubieren
- Zellen 1 x mit Permbuffer waschen
- Zellen mit Antikörperlösung in Permbuffer für 30min. bei 4°C inkubieren
- Zellen 2 x mit Permbuffer waschen
- Zellen in 100-200µl GM-Puffer aufnehmen

## 2.8.2 Verwendete FACS-Antikörper

## T-Zell Antikörper

Antigen	Klon	Isotyp	Fluorophor	Bezugsquelle
CD4	RM4-5	Rat IgG2b, $\kappa$	PacificBlue, PE-Cy7	BioLegend
CD8	53-6.7	Rat IgG2a, $\kappa$	PerCp	BD
CD62L	MEL-14	Rat IgG2a, $\kappa$	PE, FITC	BioLegend
FoxP3	FJK-16s	Rat IgG2a, $\kappa$	APC	eBioscience
ROR $\gamma$ t	AFKJS-9	Rat IgG2a, $\kappa$	APC	eBioscience
T-bet	eBio4B10	IgG1, $\kappa$	PE	eBioscience
IL-17A	eBio17B7	Rat IgG2a, $\kappa$	PE	eBioscience
IL-9	RM9A4	Rat IgG1, $\kappa$	PE	BioLegend
IL-4	11B11	Rat IgG1, $\kappa$	APC	eBioscience
IFN- $\gamma$			FITC	eigene Herstellung

## DC- &amp; Makrophagen Antikörper

Antigen	Klon	Isotyp	Fluorophor	Bezugsquelle
CD11c	N418	Hamster IgG	APC-Cy7	eBioscience
CD80	16-10A1	Hamster IgG2, $\kappa$	FITC, APC, PE	eBioscience
CD86	GL1	Rat IgG2a, $\kappa$	FITC, APC, PE	BioLegend
CD40	1C10	Rat IgG2a, $\kappa$	APC, PE	eBioscience
MHC-II	M5/114.15.2	Rat IgG2b, $\kappa$	PacificBlue	BioLegend
CD11b	M1/70	Rat IgG2b, $\kappa$	PE-Cy7	eBioscience
SRIP $\alpha$	P84	Rat IgG1, $\kappa$	PE	eBioscience
CD45RA	RA3-6B2	Rat IgG2a, $\kappa$	PE-Cy7	eBioscience
CD8 $\alpha$	53-6.7	Rat IgG2a, $\kappa$	PerCp	BD
F4/80	BM8	Rat IgG2a, $\kappa$	APC	BioLegend

---

## 2.9 Orale Toleranz

### 2.9.1 Immunmodulation durch orale Applikation von Ovalbumin

Zur Etablierung der oralen Toleranz wurde den Mäusen Ovalbumin (Grade V: Sigma Aldrich), mittels Schlundsonde intrathorakal appliziert. So war gewährleistet, dass jede Maus die gleiche Menge Ovalbumin verabreicht bekam und Ergebnisse untereinander vergleichbar waren. Kontrollgruppen, in denen keine Toleranz gegenüber Ovalbumin induziert werden sollte, bekamen reines PBS verabreicht. Die orale Applikation erfolgte jeden zweiten Tag, insgesamt fünfmal, mit jeweils 1mg Ovalbumin in 250µl PBS gelöst, bzw. mit reinem PBS.

### 2.9.2 Immunisierung der Mäuse

Die primäre Immunisierung der Mäuse erfolgte mit Ovalbumin in Kombination mit „Complete Freund's Adjuvant“ (CFA: H37 Ra, DIFCO Laboratories), zwei Tage nach der letzten Fütterung. Bei CFA handelt es sich um eine Wasser/Öl Emulsion, in welcher abgetötete *M. tuberculosis* enthalten sind. Ovalbumin wurde in PBS gelöst und auf eine Konzentration von 800µg/ml eingestellt. Das gelöste Ovalbumin (Kontrolle: reines PBS) wurde 1:1 mit CFA gemischt und mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators (Sonoplus RD2070) der Firma Bandelin zu einem hoch viskosen Gemisch emulgiert.

Folgende Einstellungen wurden für den Ultraschall-Homogenisator gewählt: Zeit: 0,5 min, 60 Zyklen, 70-80% Power.

Anschließend wurden die Mäuse mit 50µl (entspricht 20µg Ovalbumin) des Gemisches s.c. immunisiert.

### 2.9.3 Auslösen einer „delayed type hypersensitive“ Reaktion (DTH)

Die zweite Immunisierung, welche der Induktion einer DTH diene, erfolgte mit „Incomplete Freund’s Adjuvant“ (IFA: Sigma Aldrich). Bei IFA handelt es sich um eine reine Wasser/Öl Emulsion, der die abgetöteten *M. tuberculosis* fehlen und dazu dient, einen Depoteffekt zu erzielen. Die zweite Immunisierung erfolgte in die Fußballen von narkotisierten (Ketamin/Rompun) Mäusen mit entweder 20µg/25µl Ovalbumin/IFA oder mit PBS/IFA. Die Immunisierung mit PBS/IFA diene als Kontrolle, wobei als Maß der DTH die Differenz der Fußschwellung zwischen PBS/IFA (nicht-drainierende Seite) und OVA/IFA (drainierende Seite) gemessen wurde.

#### Narkosemittel:

Bestandteil	Volumen	Bezugsquelle
Ketamin (50mg/ml)	2ml	Ratiopharm GmbH
Rompun (2% Injektionslösung)	800µl	Bayer

Als Arbeitslösung wurde Ketamin/ Rompun 1:5 mit PBS verdünnt, wovon anschließend 7,5µl pro Gramm Körpergewicht der Maus i.p. injiziert wurden.

### 2.9.4 Messung der Fußschwellung als Maß der DTH

Die Fußschwellung wurde mit Hilfe eines Messgerätes, der Firma Mitutoyo gemessen. Als Maß der ausgelösten DTH wurde die Differenz aus der Fußschwellung des drainierenden Fußes und dem nicht-drainierenden Fuß angegeben.

## 2.10 Puffer und Lösungen

Puffer, Lösung, Medium	Zusammensetzung
DC-Differenzierungsmedium	ISCOVES + 5% FCS 1% Glutamin (200mM) 1% Na-Pyruvat (0,1M) 2% GM-CSF (Kulturüberstand)
Testmedium	ISCOVES + 5% FCS 1% Glutamin (200mM) 1% Na-Pyruvat (0,1M)
GM-Puffer	1x PBS (steril filtriert 0,2µm) + 0,5% BSA 1% EDTA (0,5M) 0,1% NaN <sub>3</sub>
GEY's Lysepuffer	NH <sub>4</sub> Cl (8,29g/l) + KHCO <sub>3</sub> (1g/l) + EDTA (0,037g/l) gelöst in VE-H <sub>2</sub> O
MEM (minimal essential medium) (MEM 2% FCS)	10,58g/l MEM Trockenpulver + 4,77g/l HEPES gelöst in VE-H <sub>2</sub> O + 2% FCS
PBS (Phosphate buffered saline)	1,4 M NaCl (81,8g/l) + 0,1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (15,6g/l) gelöst in VE-H <sub>2</sub> O eingestellt auf pH 7,2
Trypanblau (A+B werden im Verhältnis 1:5 gemischt)	A: 0,2% Trypanblau in VE-H <sub>2</sub> O (steril filtriert 0,2µm) B: 4,25% NaCl
Bindepuffer	1x PBS + 0,1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> eingestellt auf pH 9,2
Blockpuffer	1x PBS + 0,05% Tween20 + 1% BSA
Waschpuffer	1x PBS + 0,05% Tween20
Citratpuffer	40mM Zitronensäure + 60mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Substratlösung (ELISA)	Citratpuffer + 1mg/ml ABTS + 1/4000 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

## Material & Methode

---

Puffer, Lösung, Medium	Zusammensetzung
TBE-Puffer	89mM TRIS + 89mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> + 2mM EDTA, pH 8
1,5% Agarosegel	100ml TBE-Puffer + 1,5g Agarose
BSA (Rinderserumalbumin)	10%ige Lösung in 1x PBS (steril filtriert 0,2µm)
Genomic Lysis Buffer	300mM NaCl, 25mM EDTA, 50mM TRIS, 0,2% SDS, pH 8



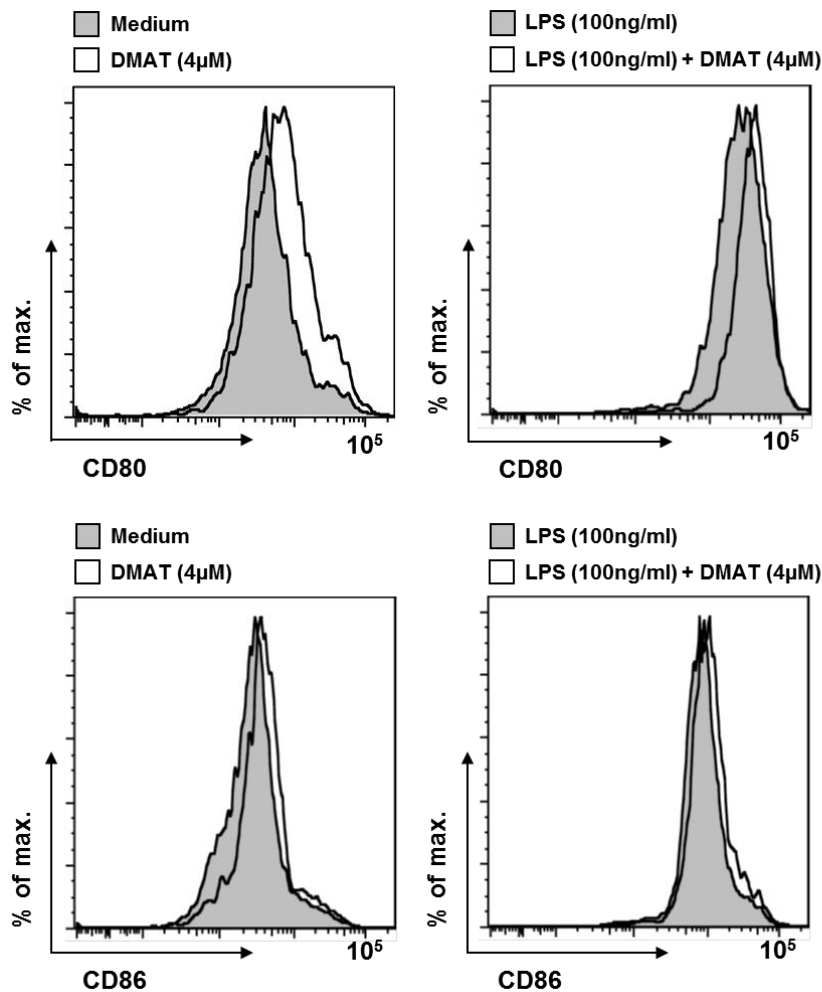
---

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Expression kostimulatorischer Moleküle in Gegenwart des CK2 Inhibitors Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole (DMAT)

Die Casein-Kinase-2 (CK2) ist an Signalwegen beteiligt, welche sowohl für die Entwicklung, als auch für den Prozess der Aktivierung von DCs eine wichtige Rolle spielen. Welchen Einfluss die Inhibition der CK2 in der Aktivierung der DCs spielt, sollte mit Hilfe eines Inhibitors (DMAT), spezifisch für CK2 untersucht werden<sup>42,43</sup>.

DCs können durch Stimulation mit z.B. Toll-like Rezeptor (TLR) Liganden aktiviert werden. Ein Merkmal für aktivierte DCs ist die verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86, so dass erste Versuche der Expression dieser Moleküle galten. Hierfür wurden BMDCs (**b**one **m**arrow derived **d**endritic **c**ells) in An- und Abwesenheit des TLR4 Liganden LPS (100ng/ml) für 16h kultiviert. Um den Einfluss der CK2 auf die Regulation der Expression von CD80 und CD86 zu analysieren, wurden die Zellen gleichzeitig mit dem CK2-spezifischen Inhibitor DMAT, oder dem entsprechenden Lösungsmittel als Kontrolle inkubiert.



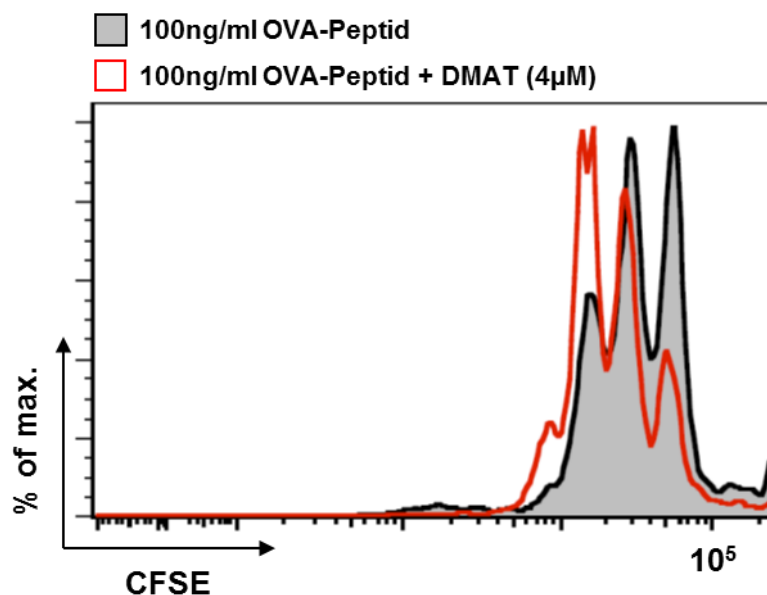
**Abb. 3.1: Stimulation von BMDCs in An- und Abwesenheit von DMAT**

$2 \times 10^5$  BMDCs wurden über Nacht unstimuliert belassen, oder mit 100ng/ml LPS stimuliert (siehe Material & Methode 2.4.8). Zusätzlich wurden unstimulierte und stimulierte BMDCs in An- und Abwesenheit des CK2-Inhibitors DMAT (4µM) inkubiert. DCs (CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> Zellen) wurden mittels FACS-Analyse auf die Expression von CD80 und CD86 untersucht.

Die Expression von CD80 und CD86 wurde als Maß der Aktivierung der BMDCs mittels Durchflusszytometrie untersucht. Wie aus Abb. 1 ersichtlich, ist die Expression von CD80 und CD86, in Gegenwart von DMAT, sowohl bei unstimulierten, als auch bei stimulierten BMDCs erhöht. Das bereits unstimulierte BMDCs in Anwesenheit von DMAT die kostimulatorischen Moleküle (CD80 /CD86) verstärkt exprimieren, zeigt, dass CK2 an der Aufrechterhaltung der Homöostase des unreifen Status von DCs beteiligt ist. Ebenfalls geht aus Abb. 1 hervor, dass die Expression von CD80 durch die Inhibition von CK2 stärker beeinflusst wurde, als die von CD86. Insgesamt führte die CK2-Inhibition zu einem stärker aktivierten Phänotyp der untersuchten BMDCs.

### 3.2 DMAT erhöht die antigenspezifische Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen

DCs sind erst nach Stimulation in der Lage, T-Zellen optimal zu aktivieren und so eine effektive adaptive Immunantwort einzuleiten. Ein Charakteristikum aktivierter T-Zellen ist die klonale Expansion als Folge einer massiven T-Zellproliferation. Die Teilungsrate der T-Zellen kann somit als Maß ihrer Aktivierung gemessen werden. Ob der aktivierte Phänotyp unstimulierter BMDCs durch Inhibition der CK2 auch zu einer stärkeren Aktivierung und Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt, sollte als nächstes analysiert werden. Aus diesem Grund wurden CFSE-markierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Material&Methode 2.4.4) mit einem transgenen T-Zellrezeptor, welcher ein Epitop aus dem Ovalbumin (OVA-Peptid<sub>323-339</sub>) erkennt (DO11.10 CD4<sup>+</sup> T-Zellen), mit BMDCs und dem entsprechenden OVA-Peptid, in An- und Abwesenheit des CK2-Inhibitors (DMAT) inkubiert. Die BMDCs wurden nicht stimuliert, da der Einfluss von DMAT auf unreife BMDCs untersucht werden sollte.



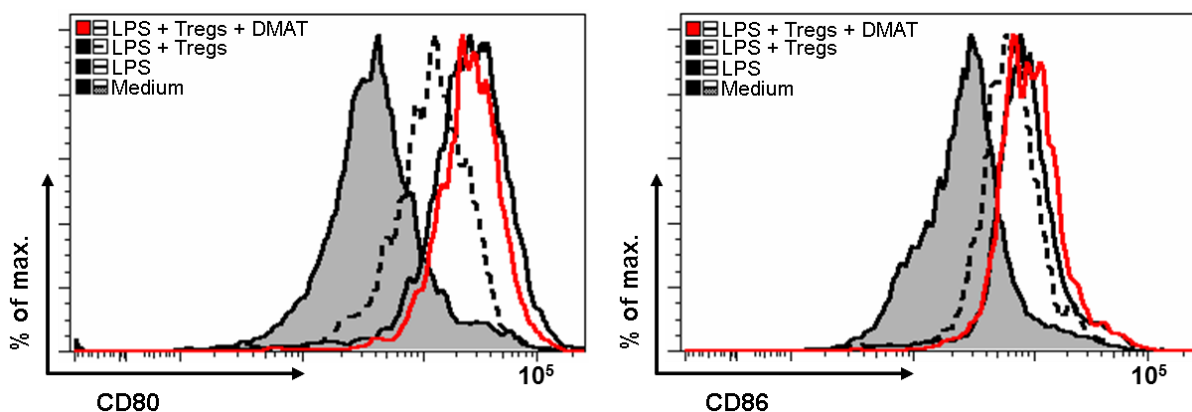
**Abb. 3.2: CFSE Proliferationsassay in An- und Abwesenheit von DMAT**

$1 \times 10^4$  BMDCs wurden mit  $1 \times 10^5$  CFSE markierten, DO11.10 CD4<sup>+</sup> T-Zellen kultiviert. Als Antigen wurde OVA-Peptid<sub>323-339</sub> (100ng/ml), in An- und Abwesenheit von DMAT (4µM), verwendet. Am Tag 3 des Proliferationsassays erfolgte die Auswertung, mittels Durchflusszytometrie. CFSE wird bei jeder Zellteilung, zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen verteilt und kann somit als Maß der Proliferation gemessen werden.

Der Proliferationsassay zeigte, dass unstimulierte BMDCs in der Lage sind, in Anwesenheit des CK2-Inhibitors (DMAT) CD4<sup>+</sup> T-Zellen wesentlich stärker zu aktivieren. Somit führt die Inhibition der CK2 zu einer Aktivierung der BMDCs in Abwesenheit stimulierender TLR-Liganden, die durch eine verstärkte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 charakterisiert ist. Hierdurch sind DCs in der Lage CD4<sup>+</sup> T-Zellen stärker zu aktivieren und so zur Proliferation anzuregen.

### 3.3 Suppression von BMDCs durch Tregs in An- und Abwesenheit von DMAT

Die vorangegangenen Versuche zeigten, dass DCs in Gegenwart von DMAT einen aktivierten Phänotyp besitzen und zu einer verstärkten Stimulierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen führten. Um Immunreaktionen in Abwesenheit von Gefahrensignalen zu vermeiden oder um Immunreaktionen zu regulieren, interagieren regulatorische T-Zellen (Tregs) mit DCs. Tregs können eine Aktivierung der DCs und somit überschießende oder fehlgeleitete Immunantworten verhindern, indem sie z.B. die Expression von CD80 und CD86 supprimieren. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob Tregs in der Lage sind DCs nach Inhibition der CK2 in ihrer Aktivierung zu hemmen.



**Abb. 3.3: Treg-vermittelte Suppression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 in Gegenwart von DMAT**

2 x 10<sup>5</sup> BMDCs wurden in An- und Abwesenheit von DMAT (4µm) und LPS (100ng/ml) stimuliert und in einem Verhältnis von 1:3 (DC:Treg) mit regulatorischen T-Zellen über Nacht kultiviert (siehe Material & Methode 2.4.3). Die Tregs wurden polyklonal, mittels αCD3 (3µg/ml) aktiviert. Als Maß der DC-Aktivierung wurde die Expression von CD80 und CD86 im Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt ist die CD80 und CD86 Expression der DCs (CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> Zellen).

---

Tregs sind in der Lage DCs in ihrer Expression von CD80 und CD86 aktiv zu hemmen. Aus Abbildung 3 geht hervor, dass die Expression der kostimulatorischen Moleküle in Gegenwart von Tregs deutlich geringer ist als die Expression bei LPS stimulierten DCs. Des Weiteren zeigte dieser Versuch, dass die Inhibition der CK2 zu einer verminderten Supprimierbarkeit der DCs durch Tregs führte.

Die hier verwendeten *in vitro* Systeme erlauben es nicht den Einfluss von DMAT auf die T-Zellen alleine zu überprüfen. Auch aus diesem Grund ist es wichtig, die CK2-Defizienz spezifisch für DCs in einer konditionellen Knock-out Maus zu untersuchen.

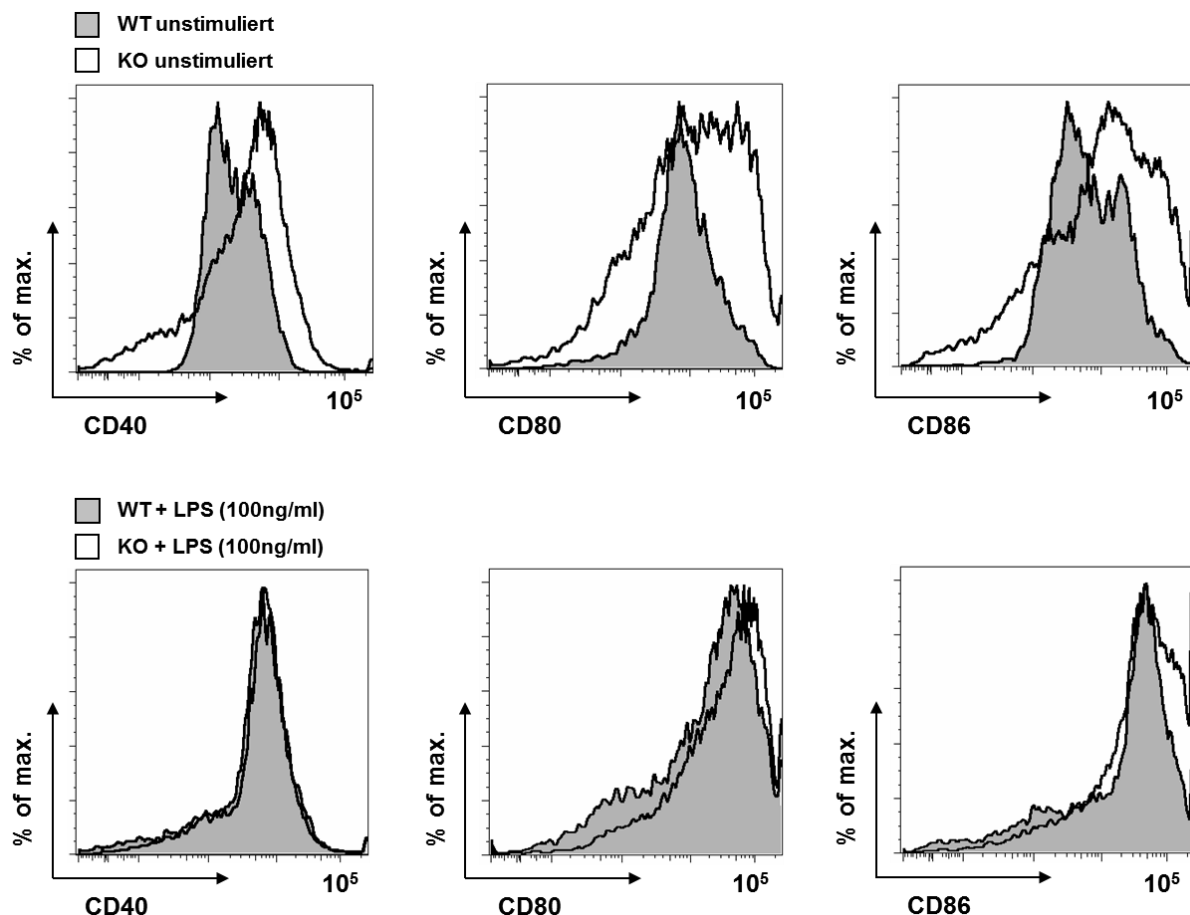
### 3.4 Generierung einer konditionellen Knock-out Maus, CD11c-cre x CK2 $\beta^{fl/fl}$

Die bisher beschriebenen Vorversuche haben gezeigt, dass die CK2 eine wichtige Rolle in der Homöostase bzw. in der Aktivierung von DCs spielt. Da DCs das Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem darstellen und darüber hinaus auch die Qualität der T-Zellantworten (z.B. Th1-, Th2-, Th9- Th17-Antworten) bestimmen, sollte die Funktion der CK2 genauer untersucht werden. Da für fast alle Kinase Inhibitoren eine vermeintliche Unspezifität nicht restlos ausgeschlossen werden kann, wurde für die weiterführenden Analysen eine Maus gezüchtet, in welcher die CK2 exklusiv in DCs deletiert ist. Eine anerkannte Methode, um speziell in DCs ein Gen auszuschalten, ist die Verwendung des Cre/loxP-Rekombinationssystems (siehe Material & Methode 2.2), wobei unter der Kontrolle des CD11c-Promotors ein Exon der CK2- $\beta$  Untereinheit der CK2 entfernt wurde, wodurch in den CD11c<sup>+</sup> Zellen (DCs) keine funktionelle CK2 vorliegt. Die so gezüchteten, konditionellen CK2-defizienten Mäuse werden als CD11c-cre x CK2 $\beta^{fl/fl}$  bezeichnet und zur Vereinfachung im Folgenden nur als Knock-out (KO) benannt, entsprechende Kontrolltiere wurden als Wildtyp (WT) gekennzeichnet. Für alle weiteren Versuche wurden nur Tiere verwendet, welche positiv für die Cre-Rekombinase sowie homozygot für das gefloxt CK2 $\beta$ -Allel waren.

### 3.5 Expression kostimulatorischer Moleküle auf WT und KO BMDCs

BMDCs lassen sich leicht aus Knochenmarkszellen, in Gegenwart des Zytokins GM-CSF, differenzieren und stehen anschließend in ausreichender Zahl für verschiedene Untersuchungen zur Verfügung. Aus diesem Grund erfolgten erste Versuche mit BMDCs aus KO Mäusen, wobei als Kontrolle BMDCs aus WT Mäusen dienten. Die Analyse von *in vitro* generierten BMDCs hat den weiteren Vorteil, dass eine mögliche Veränderung des Phänotyps in CK2-defizienten DCs intrinsischer Natur ist und nicht durch äußere Einflüsse induziert wurde.

Analog zu 3.1 wurden in einem ersten Versuch, KO und WT BMDCs für 16h mit LPS (100ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD40, CD80 und CD86 analysiert.



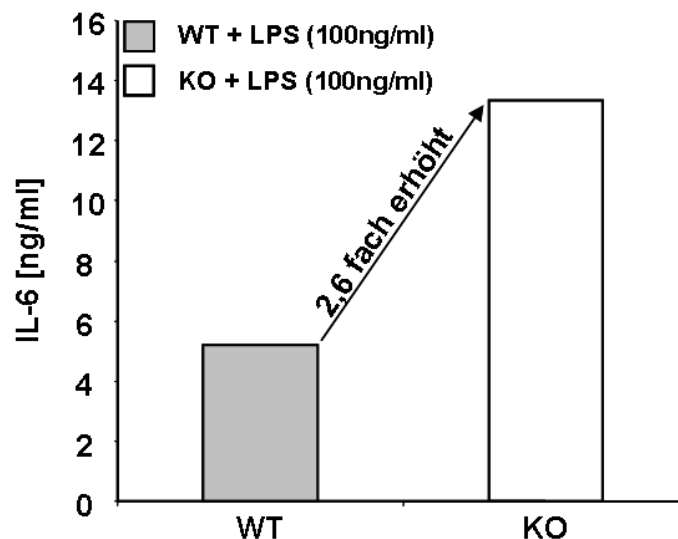
**Abb. 3.4: Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86**

$2 \times 10^5$  WT und KO BMDCs wurden für 16h mit LPS (100ng/ml) bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  stimuliert, oder unstimuliert belassen. Dargestellt ist die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 der DCs ( $\text{CD11c}^+ \text{MHCII}^+$  Zellen).

Die Ergebnisse in Abb. 3.4 zeigen, dass KO BMDCs, im Vergleich zu WT BMDCs, bereits in unstimuliertem Zustand eine deutlich stärkere Aktivierung zeigen. Diese Beobachtung stimmte mit den Versuchen des CK2 Inhibitors überein (siehe 3.1) und bekräftigt somit die Annahme, dass die CK2 eine wichtige Rolle in der Homöostase Dendritischer Zellen spielt.

### 3.6 Bestimmung des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (IL-6)

Für eine Entzündungsreaktion und die Initiierung einer adaptiven Immunantwort müssen DCs nicht nur Antigen präsentieren und verstärkt kostimulatorische Moleküle (CD40, CD80, CD86) exprimieren, sondern auch pro-inflammatorische Zytokine sezernieren. Ein Zytokin, welches eine Entzündungsreaktion einleiten und entscheidend beeinflussen kann, ist Interleukin (IL)-6. IL-6 gehört zu den fieberauslösenden endogenen Pyrogenen und ist z.B. in der Lage eine Akute-Phase-Reaktion auszulösen. Darüber hinaus kann IL-6 die Qualität der T-Zellantwort entscheidend mitbestimmen, indem es z.B. die Differenzierung naiver T-Zellen in T-Helferzellen von Typ 17 (Th17 Zellen) lenken kann. Um zu überprüfen, ob KO BMDCs mehr IL-6 produzieren als WT BMDCs, wurde der Kulturüberstand aktivierter BMDCs, mittels ELISA analysiert (siehe Material & Methode 2.5).



**Abb. 3.5: Produktion von IL-6 durch WT und KO BMDCs**

Der Kulturüberstand von  $2 \times 10^5$  BMDCs wurde, mittels ELISA, auf das Zytokin IL-6 untersucht. Sowohl WT, als auch KO BMDCs wurden mit LPS (100ng/ml) für 16h bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> stimuliert. Die Stimulation erfolgte in 96-Well-Rundbodenplatten in einem Gesamtvolumen von 200µl.

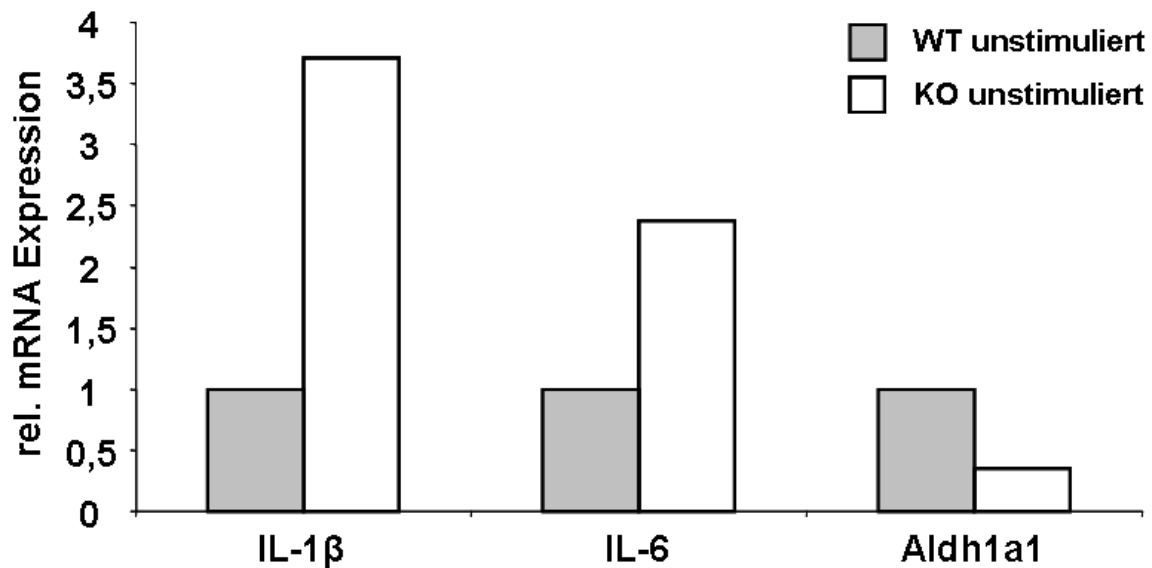
Nach 16h Stimulation mit LPS war im Kulturüberstand der KO BMDCs im Vergleich mit WT BMDCs die 2,6-fache Konzentration an IL-6 nachweisbar. Somit zeigen KO DCs, nicht nur in Bezug auf die Expression kostimulatorischer Moleküle, einen stärker aktivierten Phänotyp, sondern KO DCs bilden auch mehr des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6.

### **3.7 Genexpressionsanalyse von *Il-6*, *Il-1 $\beta$* und *Aldh1a1* in WT und KO BMDCs**

Neben IL-6 ist IL-1 $\beta$  ein weiteres pro-inflammatorisches Zytokin, welches ebenfalls zu den endogenen Pyrogenen zählt und an der Akute-Phase-Reaktion beteiligt ist. Darüber hinaus fördert es ebenfalls die Differenzierung bestimmter T-Helferzellen (Th17).

Den gegenteiligen Effekt, zu den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-6 und IL-1 $\beta$ , bewirkt in DCs das Vitamin-A metabolisierende Enzym *Aldh1a1* (Aldehyd Dehydrogenase 1A1). *Aldh1a1* ist in der Lage, Retinsäure zu bilden, in deren Gegenwart naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Tregs konvertiert werden können. Besonders im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe (Gut-associated lymphoid tissues, GALT) ist diese Treg-Differenzierung von großer Bedeutung, um hier unverhältnismäßige Immunantworten gegen harmlose Nahrungsantigene oder kommensale Bakterien zu verhindern. Ob in KO BMDCs im Vergleich mit WT BMDCs diese Gene unterschiedlich stark exprimiert werden, sollte mittels einer quantitativen RT-PCR (qRT-PCR) untersucht werden. Hierfür wurde die gesamte RNA aus unstimulierten Zellen (WT und KO BMDCs) isoliert und in cDNA umgeschrieben, welche dann für eine Analyse der Genexpression diente.





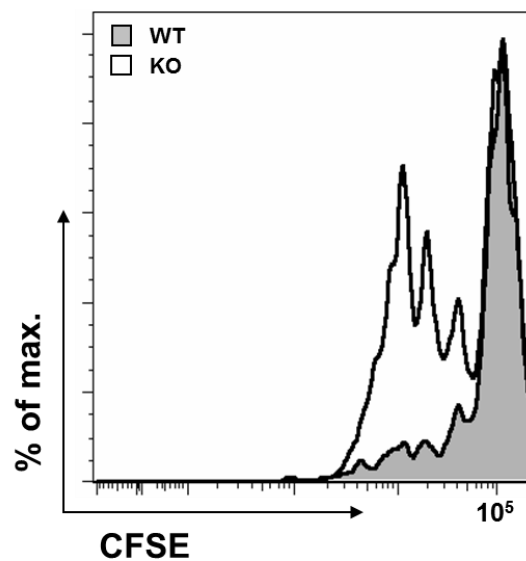
**Abb. 3.6: Genexpressionsanalyse von WT und KO BMDCs**

Aus  $5 \times 10^5$  unstimulierten BMDCs (WT gegen KO) wurde die RNA isoliert und mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die gewonnene cDNA diente als Matrize für eine Analyse der Genexpression von *Il-1 $\beta$* , *Il-6*, sowie *Aldh1a1*. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte mittels Real-Time-PCR (qRT-PCR), wobei *Hgprt* als Haushaltsgen diente.

In Bezug auf IL-6 wurde der vorherige Versuch bestätigt. Bereits unstimulierte KO BMDCs zeigten eine erhöhte *Il-6* Genexpression, was im Einklang mit einer erhöhten IL-6 Konzentration im Kulturüberstand stimulierter KO BMDCs steht. Auch für das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  konnte eine verstärkte Genexpression in KO BMDCs im Vergleich mit WT BMDCs nachgewiesen werden. Auf der anderen Seite ist die Genexpression für das Enzym Aldh1a1 in KO BMDCs geringer als in WT BMDCs. Aldh1a1 ist für die Differenzierung von Tregs aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen mitverantwortlich und trägt so zu einem tolerogenen Milieu, besonders im GALT bei. Zusammengefasst bestätigt diese Genexpressionsanalyse, dass die DC-spezifische Defizienz der CK2 zu einem Phänotyp aktivierter DCs führt.

### 3.8 T-Zell-Proliferationsassay mit WT und KO BMDCs als akzessorische Zellen

Alle bisherigen Ergebnisse zeigten, dass DCs aus CD11c-cre x CK2 $\beta^{fl/fl}$  Mäusen bereits ohne Stimulus einen Phänotyp aktivierter DCs zeigten. Aus diesem Grund sollte analog zu 3.2 überprüft werden, ob KO BMDCs stärkere T-Zellantworten als WT BMDCs einleiten können. Hierfür wurden wiederum DO11.10 CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert, mit CFSE markiert und anschließend mit WT oder KO BMDCs in Gegenwart von OVA-Peptid<sub>323-339</sub> stimuliert. Die Proliferation wurde mittels Durchflusszytometrie anhand des CFSE-Signals bestimmt.



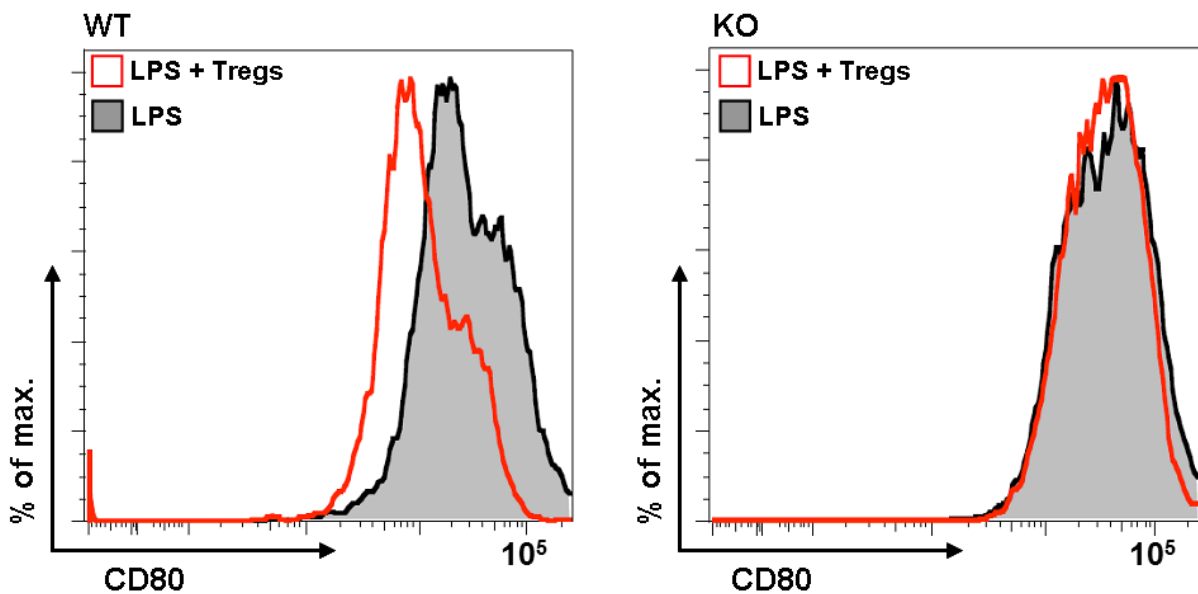
**Abb. 3.7: Proliferationsassay mit KO, oder WT BMDCs als akzessorische Zellen.**

Es wurden sowohl WT, als auch KO BMDCs (je  $1 \times 10^3$ ) in einem Verhältnis von 1:30 mit OVA-tg CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $3 \times 10^4$ ) kultiviert. Die Kultur erfolgte in einer 96-Well-Rundbodenplatte in einem Gesamtvolumen von 200 $\mu$ l und in Gegenwart von 100ng/ml OVA-Peptid. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden zuvor mit CFSE (Endkonzentration 2 $\mu$ M) markiert. Die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde an Tag 4 der Kultur, mittels FACS-Analyse, bestimmt.

Um den Unterschied der Fähigkeit zur T-Zellaktivierung zwischen WT und KO BMDCs herauszuarbeiten, wurden die Konditionen des Proliferationsassays bewusst im limitierenden Bereich angesetzt. So wurden BMDCs in einem Verhältnis von 1:30 mit DO11.10 CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Gegenwart von OVA-Peptid<sub>323-339</sub> kultiviert. Auf eine zusätzliche Stimulation der BMDCs wurde verzichtet. Abb. 3.7 zeigt deutlich, dass KO BMDCs eine starke T-Zellproliferation induzieren, während WT BMDCs unter diesen Bedingungen nicht in der Lage sind T-Zellen zu aktivieren.

### 3.9 Suppression von WT und KO BMDCs durch regulatorische T-Zellen

Die Versuche mit DMAT zeigten, dass die Inhibition der CK2 zu einer verminderten Empfänglichkeit der DCs gegenüber Treg-vermittelter Suppression führt (siehe 3.3). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die Expression kostimulatorischer Moleküle durch BMDCs aus KO-Mäusen durch Tregs supprimiert werden kann. Exemplarisch wurde hier die Expression von CD80 gemessen, da in den vorangegangenen Versuchen nach CK2 Inhibition durch DMAT, die deutlichsten Unterschiede zu beobachten waren.



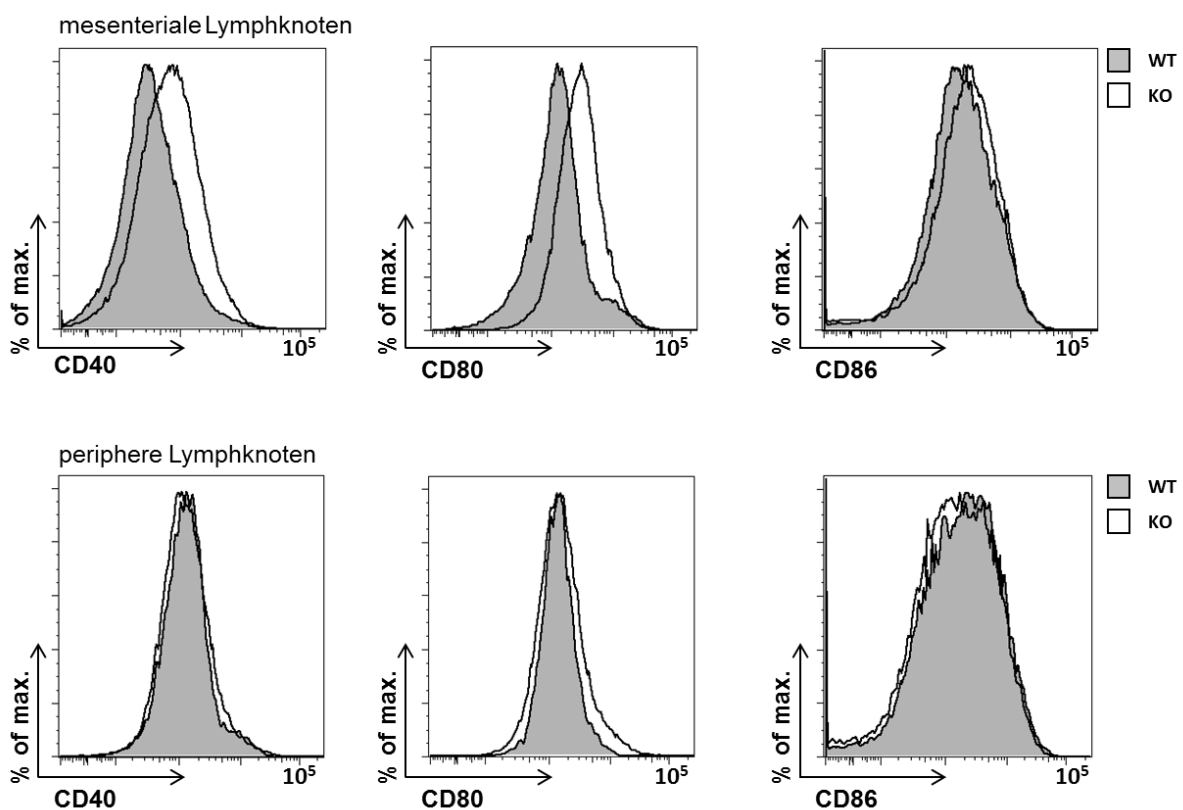
**Abb. 3.8: Treg-vermittelte Suppression des kostimulatorischen Moleküls CD80**

Es wurden jeweils  $2 \times 10^5$  BMDCs (WT oder KO) in einem 1:3 Verhältnis mit Tregs über Nacht kultiviert. Zur Aktivierung der DCs wurde LPS (100ng/ml) und zur polyklonalen Aktivierung der Tregs wurde  $\alpha$ -CD3 (3 $\mu$ g/ml) in der Kultur verwendet. Um DCs und Tregs im Durchflusszytometer charakterisieren zu können, wurden die Zellen auf CD11c, MHC-II und CD90, einem T-Zell-spezifischen Molekül, gefärbt. Dargestellt ist hier die CD80 Expression der CD90 negativen und CD11c, MHC-II positiven Zellen.

Wie bei den DC-Treg Kokulturversuchen in Gegenwart von DMAT konnte auch bei diesem Versuch beobachtet werden, dass die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 von KO BMDCs nicht durch Tregs supprimiert werden kann. Somit zeigten BMDCs aus KO in gleicher Weise wie BMDCs nach Inhibition der CK2 einen stark aktivierten Phänotyp, welcher selbst durch Tregs nicht mehr kontrolliert bzw. supprimiert werden kann.

### 3.10 Analyse der kostimulatorischen Moleküle von Dendritischen Zellen *ex vivo*

Um zu überprüfen, ob der *in vitro* beobachtete Phänotyp der BMDCs auch in *in vivo* differenzierten DCs vorhanden ist, wurden diese Zellen aus der Peripherie (inguinale Lymphknoten, popliteale Lymphknoten) sowie aus dem GALT (mesenteriale Lymphknoten) isoliert und auf die Expression von CD80, CD86 und CD40 untersucht. Die isolierten DCs (CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> Zellen) wurden nach deren Isolation direkt mit Fluorophor-markierten Antikörpern spezifisch für CD80, CD86 und CD40 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Da insbesondere der Phänotyp von nicht-aktivierten DCs von Interesse war, wurde auf eine weitere Stimulation der Zellen *ex vivo* verzichtet.

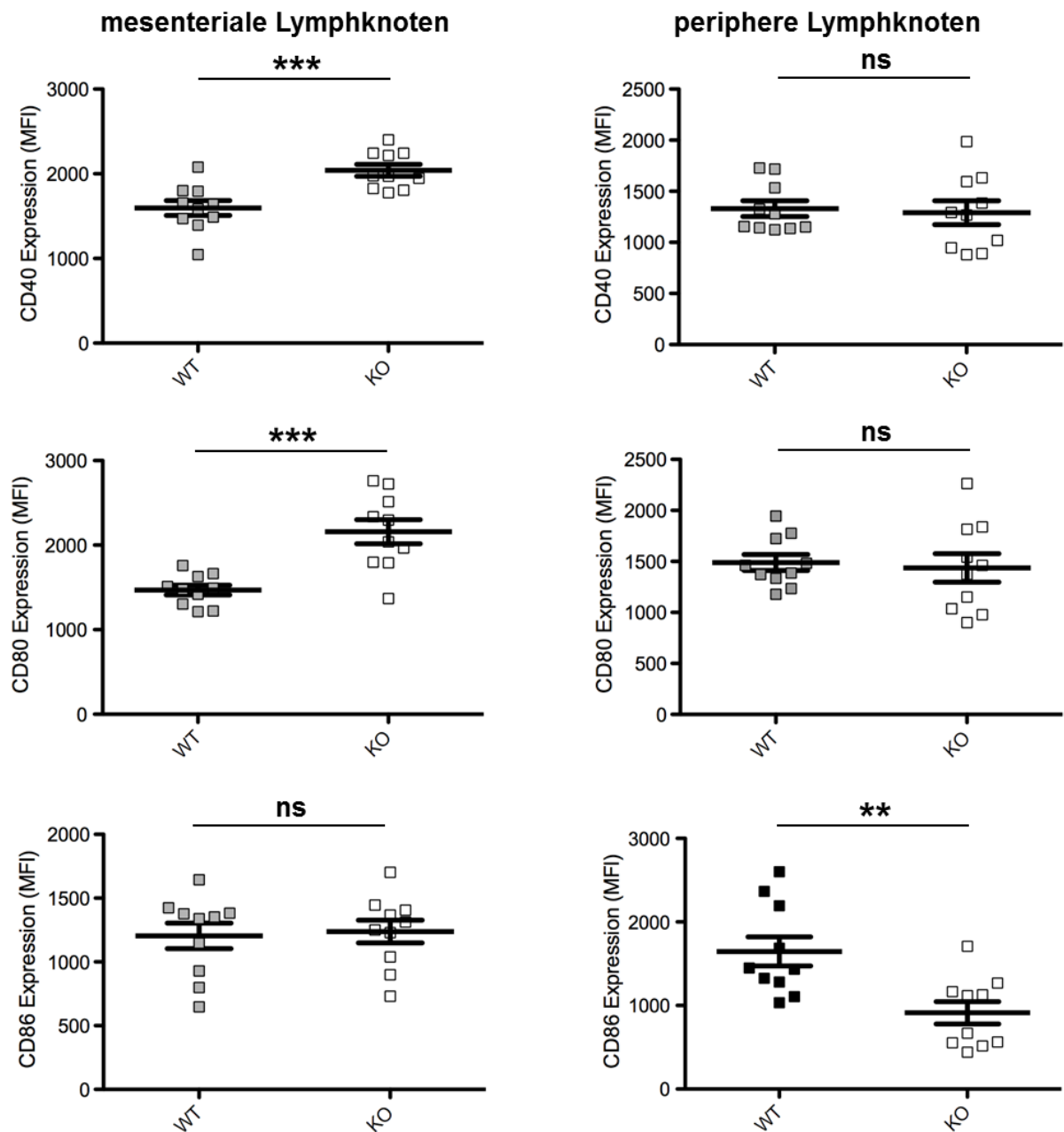


**Abb. 3.9: Expression kostimulatorischer Moleküle von DCs aus mesenterialen Lymphknoten, sowie von peripheren Lymphknoten**

Mesenteriale- und periphere Lymphknoten wurden steril entnommen und die DCs wurden unter Verwendung von DNaseII (0,1mg/ml) und KollagenaseI (1mg/ml), wie in Material & Methode 2.4.5 beschrieben, gewonnen. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 wurde durch eine FACS-Analyse bestimmt. In einem Histogramm ist hier vergleichend die Expression von CD40, CD80 und CD86, der CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> Zellen (WT gegen KO) logarithmisch dargestellt.

---

Die Analyse von *ex vivo* DCs hat gezeigt, dass die gezielte Ablation der CK2 unter der Kontrolle des CD11c-Promotors auch zu einem stärker aktivierten Phänotyp von DCs *in vivo* führte. Hierbei muss jedoch zwischen der Peripherie (inguinale- und popliteale Lymphknoten) und dem GALT (mesenteriale Lymphknoten) unterschieden werden. Während DCs aus der Peripherie im Vergleich zwischen WT und KO Mäusen keinen Unterschied in der Expression der Aktivierungsmarker CD40, CD80 und CD86 zeigten, zeigten DCs aus den mesenterialen Lymphknoten in Bezug auf diese Moleküle eine verstärkte Expression. Um diese Beobachtung statistisch abzusichern, wurden jeweils 10 WT und KO Mäuse auf den Aktivierungszustand der DCs aus Peripherie und GALT untersucht.



**Abb. 3.10: Zusammenfassung der CD40, CD80 und CD86 Expression Dendritischer Zellen aus mesenterialen- und peripheren Lymphknoten**

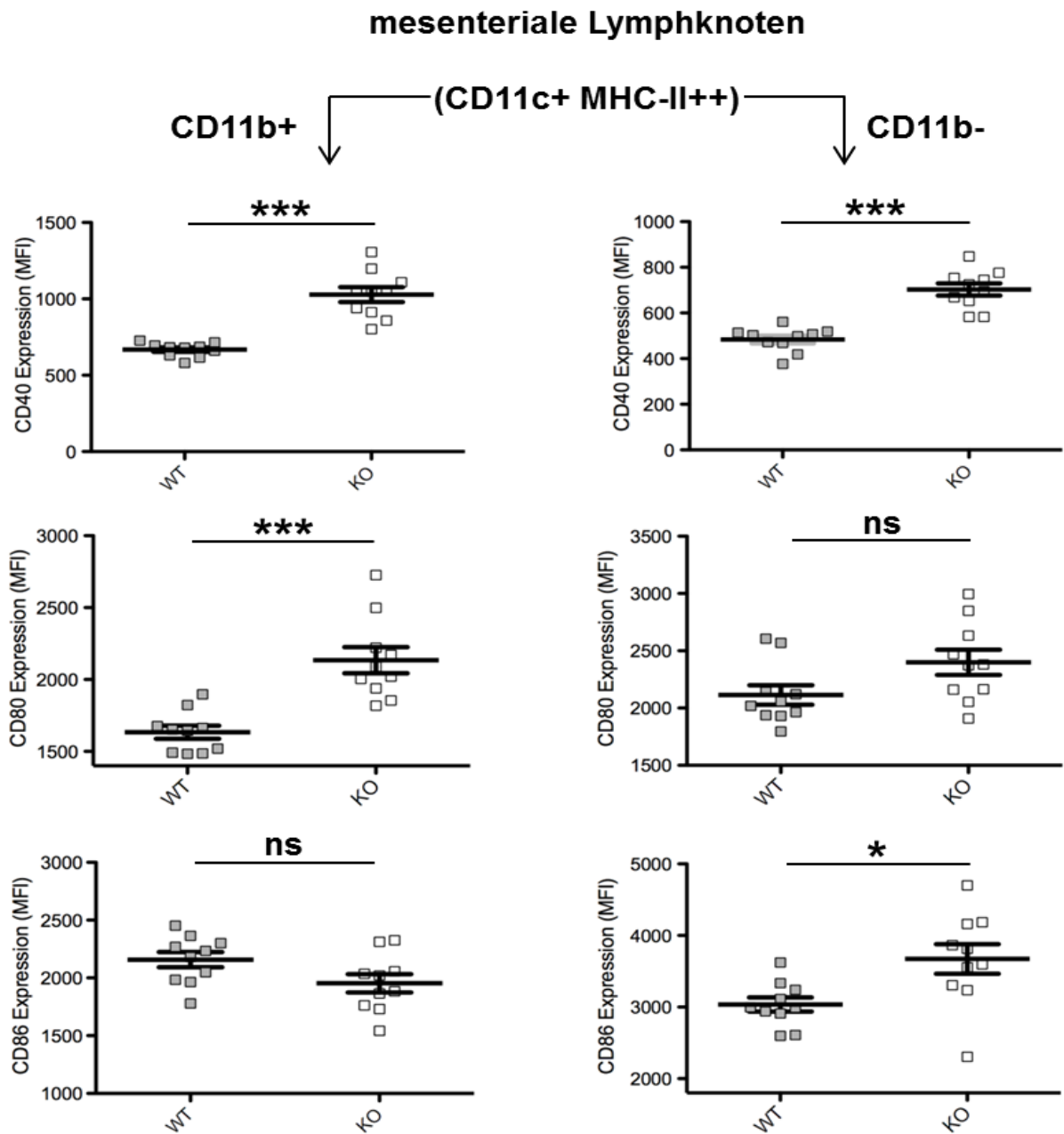
Es wurden jeweils von 10 Tieren (WT gegen KO) die mesenterialen-, sowie die peripheren Lymphknoten steril entnommen, um die DCs mittels DNaseII (0,1mg/ml) und KollagenaseI (1mg/ml) zu gewinnen. Die Zellen wurden direkt nach der Aufreinigung für eine FACS-Analyse vorbereitet. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Expression von CD40, CD80 und CD86 der CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> Zellen.

---

Dieser Versuch hat die vorausgegangene Beobachtung bestätigt und zeigte, dass DCs aus dem GALT (mesenterialer Lymphknoten) nach Ablation der CK2 deutlich aktiver in Bezug auf die Expression von CD40 und CD80 sind. Eine verstärkte Expression von CD86 war bei diesen DCs jedoch nicht zu beobachten. Es wurde durch diesen Versuch ebenfalls bestätigt, dass die Defizienz der CK2 nicht alle DCs gleichermaßen betraf, da DCs aus der Peripherie (inguinale- und popliteale Lymphknoten) keine verstärkte Expression der Moleküle CD40 und CD80 zeigten und in Bezug auf CD86 sogar eine geringere Expression besaßen.

### **3.11 Charakterisierung der DC Subpopulationen aus der Peripherie, sowie den Darm-assoziierten lymphatischen Organen (GALT)**

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Defizienz in der CK2 zu stärker aktivierten DCs speziell im GALT (mesenteriale Lymphknoten), nicht aber in der Peripherie (inguinale- und popliteale Lymphknoten) führte. Hierbei wurden bisher nur die CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> Zellen betrachtet, wodurch die Gesamtheit aller DCs identifiziert werden kann, jedoch keine Unterscheidung in DC-Subpopulationen möglich ist. Daher sollte in weiteren Versuchen eine genauere Betrachtung von DC-Subpopulationen erfolgen, um die Auswirkung der CK2-Defizienz in diesen zu charakterisieren. Aus diesem Grund wurden die CD11c<sup>+</sup> Zellen in MHC-II stark- (MHC-II<sup>++</sup>) und schwach- (MHC-II<sup>+</sup>) exprimierende Zellen unterteilt. Im nachfolgenden werden nur die MHC-II<sup>++</sup> DCs betrachtet, da in diesen DCs der Unterschied zwischen WT und KO am stärksten ausgeprägt war. Zusätzlich wurden die MHC-II<sup>++</sup> DCs in CD11b<sup>+</sup> und CD11b<sup>-</sup> Zellen unterteilt. Diese beiden DC-Subpopulationen wurden erneut auf die Expression kostimulatorischer Moleküle untersucht.



**Abb. 3.11: Darstellung der CD11b positiven und negativen DCs aus mesenterialen Lymphknoten (GALT)**  
 Aus mesenterialen Lymphknoten wurde unter Verwendung von DNaseII (0,1mg/ml) und KollagenaseI (1mg/ml) eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die so gewonnen Zellen wurden auf folgende Oberflächenmarker gefärbt: CD3, B220, CD11c, MHC-II, CD11b, sowie auf CD40, CD80 und CD86. Dargestellt ist mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD40, CD80 und CD86 der CD3<sup>-</sup>, B220<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>, MHC-II<sup>++</sup> CD11b<sup>+</sup> (linke Seite), sowie der CD3<sup>-</sup>, B220<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>, MHC-II<sup>++</sup> CD11b<sup>-</sup> Zellen.



---

Bei der Auswertung der CD40, CD80 und CD86 Expression (WT gegen KO) der verschiedenen DC-Subpopulationen zeigte sich, dass der größte Unterschied in den CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>++</sup> Zellen zu finden war. DCs mit diesem Phänotyp (CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>++</sup>) werden als „migratory DCs“ bezeichnet, welche nach Antigenaufnahme in die drainierenden Lymphknoten wandern, um dort eine adaptive Immunantwort einzuleiten. Bei der weiteren Unterscheidung der „migratory DCs“ in CD11b<sup>+</sup> und CD11b<sup>-</sup> zeigte sich, dass die CD11b<sup>+</sup> „migratory DCs“ aus KO Mäusen im Vergleich mit WT Mäusen den am stärksten aktivierten Phänotyp besaßen. So zeigten die KO CD11b<sup>+</sup> „migratory DCs“ eine deutlich stärkere Expression von CD40 und CD80 im Vergleich mit WT CD11b<sup>+</sup> „migratory DCs“.

In den vorangegangenen Versuchen zeigten DCs aus der Peripherie keinen Unterschied zwischen KO und WT Mäusen in ihrem Aktivierungszustand. Nach der Identifizierung der CD11b<sup>+</sup> „migratory DCs“ als Subpopulation mit dem am stärksten veränderten Phänotyp sollte diese Subpopulation erneut in der Peripherie untersucht werden.

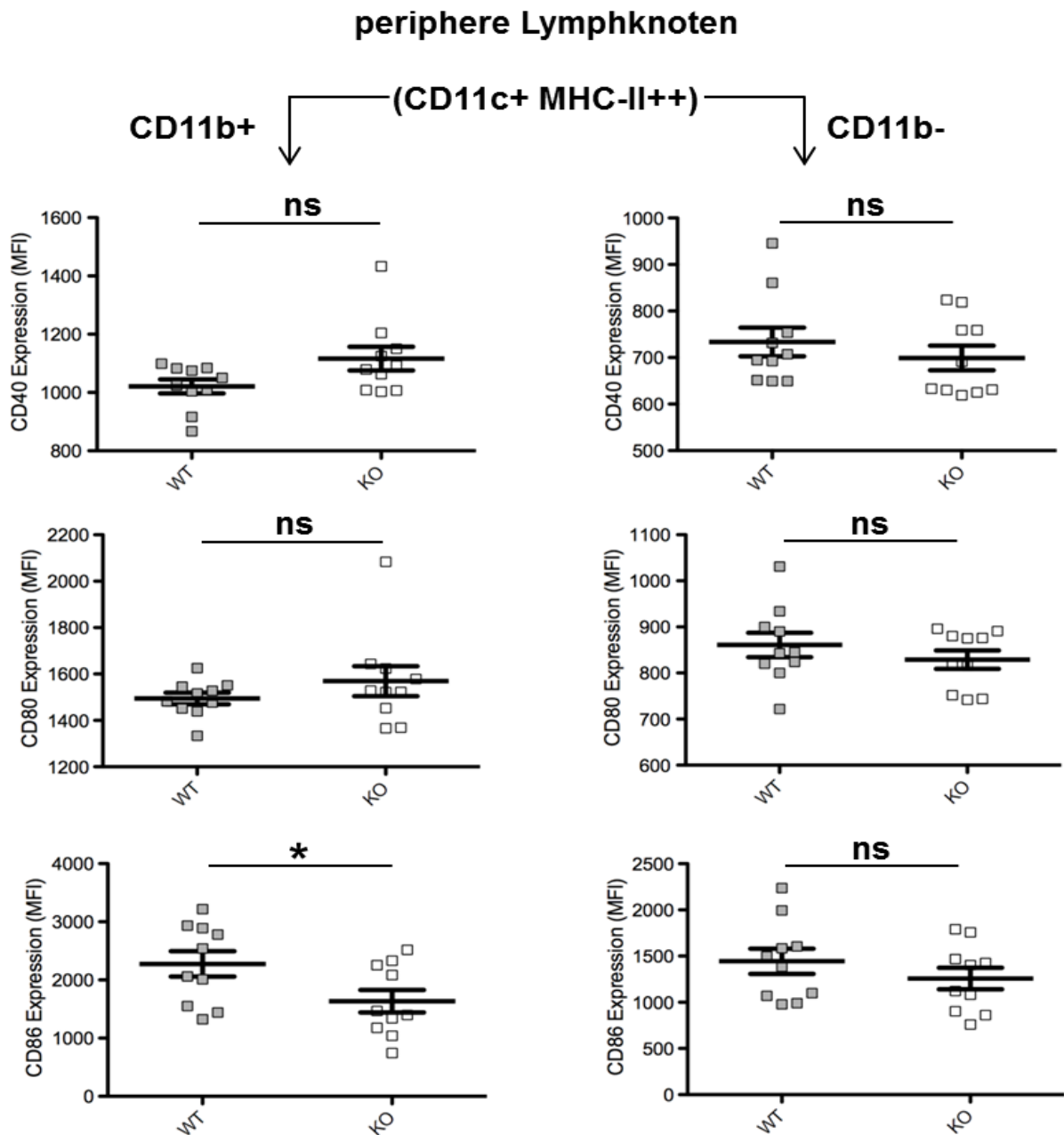


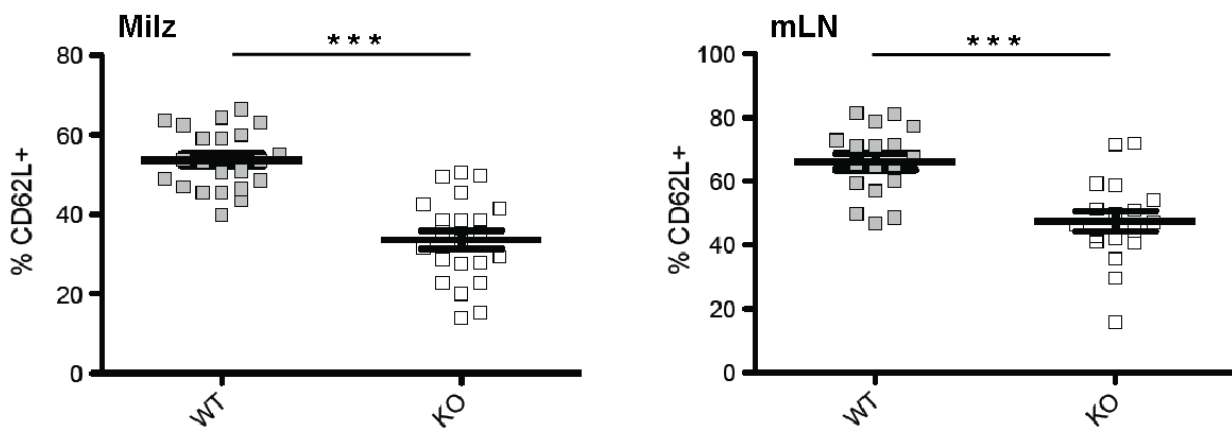
Abb. 3.12: Darstellung der CD11b<sup>+</sup>-positiven und -negativen DCs aus der Peripherie (inguinale- und popliteale Lymphknoten)

Die Zellen wurden wie in Abb.11 beschrieben isoliert und für eine FACS-Analyse vorbereitet.

Auch die Betrachtung der DC-Subpopulationen in der Peripherie zeigte, dass die CK2-Defizienz keinen Einfluss auf periphere DCs in Bezug auf die Expression kostimulatorischer Moleküle CD80, CD86 und CD40 hat. Somit kann festgestellt werden, dass die CK2 eine entscheidende Rolle in der Homöostase im GALT, und hier im Besonderen für die Reifung der CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>++</sup> CD11b<sup>+</sup> DC-Subpopulation spielt.

### 3.12 Untersuchung der naiven T-Zellpopulation in KO und WT Tieren

T-Zellen werden als naive T-Zellen bezeichnet, wenn sie noch keinen Kontakt zu ihrem Antigen hatten und somit noch nicht durch DCs aktiviert wurden. Ein Merkmal naiver T-Zellen ist die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle, sowie Chemokinrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche, welche es ihnen ermöglicht, in lymphoide Organe einzuwandern und so zu den Antigen-Präsentierenden-Zellen zu gelangen. Ein solches, von naiven T-Zellen exprimiertes Adhäsionsmolekül, ist CD62L (L-Selektin). Nach der Aktivierung durch DCs verringert sich die Expression von CD62L auf der Zelloberfläche der T-Zellen, so dass man anhand der Expression von CD62L zwischen naiven und aktivierten T-Zellen unterscheiden kann. Für die Untersuchung der naiven, CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen wurden aus Milzen und mesenterialen Lymphknoten (GALT), von WT und KO Mäusen, Zellsuspensionen hergestellt und die Expression von CD62L der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt.



**Abb. 3.13: Verteilung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen in WT und KO Tieren.**

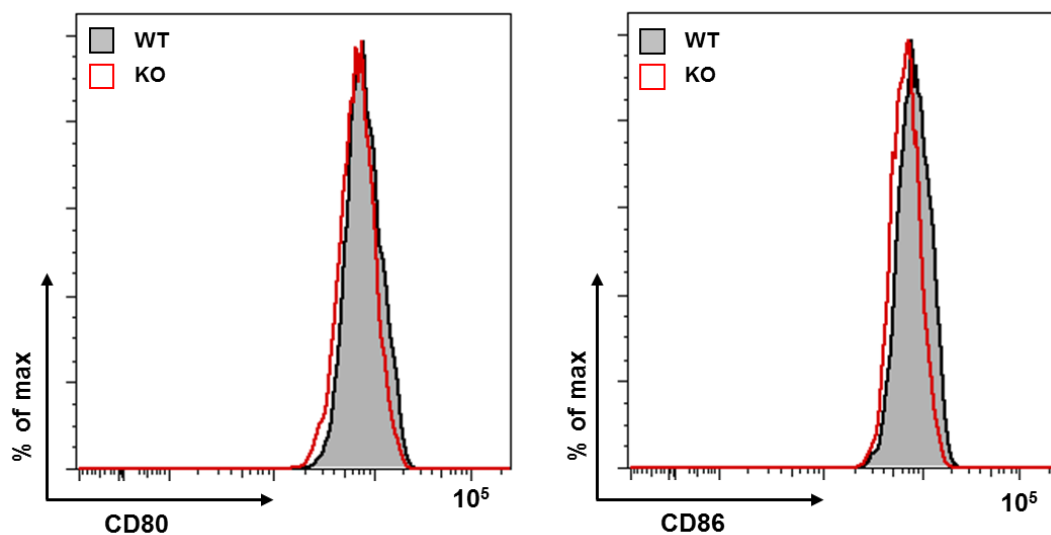
Zur Bestimmung des prozentualen Anteils der naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wurden WT und KO Tiere, verschiedenen Alters (5-20 Wochen) untersucht. Es wurden Zellsuspensionen aus Milzen und mesenterialen Lymphknoten hergestellt und diese, mittels FACS-Analyse, auf die Expression von CD62L (L-Selektin) auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der naiven (CD62L<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> T-Zellen aller Altersgruppen.

Für diesen Versuch wurden die naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen aus Mäusen verschiedenen Alters untersucht, wobei die jüngsten Tiere 5 Wochen und die ältesten Tiere 20 Wochen alt waren. In Abb. 3.13 wurden alle Altersgruppen zusammengefasst. Es war zu beobachten, dass in den KO Tieren die naive CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation stets geringer im Vergleich zu den WT Tieren war. Dieser Unterschied konnte bereits bei Tieren im Alter von 5 Wochen beobachtet werden. Jedoch wurde die naive CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation in den KO Tieren nicht

mit zunehmendem Alter kleiner. Der aktivierte Phänotyp der KO DCs manifestiert sich somit bereits sehr früh in den KO Tieren und führt zu einer deutlich erhöhten Zahl aktivierter, vermeintlich autoreaktiver T-Zellen. Dies ist sowohl in den CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen im GALT (mesenteriale Lymphknoten) als auch in der Milz zu beobachten und lässt auf eine Auswanderung der T-Zellen in die Peripherie nach Aktivierung im GALT schließen.

### 3.13 Analyse der Expression kostimulatorischer Moleküle von Makrophagen

In dieser Arbeit wurde die CK2 unter der Kontrolle des CD11c-Promotors deletiert, um die Funktion dieser Kinase in DCs zu untersuchen. Es ist jedoch bekannt, dass auch Makrophagen geringe Mengen CD11c auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dies kann unter Umständen zu einer Deletion des Zielgens nicht nur in DCs sondern auch in Makrophagen führen<sup>50</sup>. Aus diesem Grund wurden hier Makrophagen aus WT und KO Mäusen auf die Expression kostimulatorischer Moleküle CD80 und CD86 untersucht, um auszuschließen, dass die beobachtete, gesteigerte Aktivierung autoreaktiver T-Zellen auch auf Makrophagen zurückzuführen ist. Eine etablierte Methode zur Gewinnung von Makrophagen ist die peritoneale Lavage (Spülung der Bauchhöhle), wobei die Makrophagen anhand der Expression von F4/80 im Durchflusszytometer charakterisiert werden können.



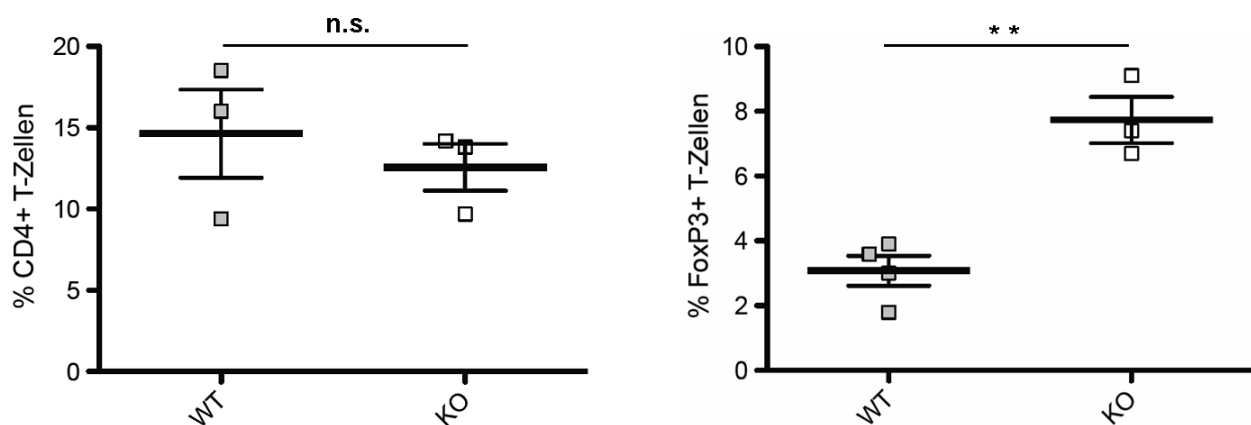
**Abb. 3.14: Untersuchung der CD80 und CD86 Expression von Makrophagen**

Makrophagen wurden aus der Bauchhöhle, von sowohl WT als auch KO Tieren, mittels einer peritonealen Lavage gewonnen. Um Makrophagen identifizieren zu können wurden die gewonnenen Zellen auf den Makrophagenmarker F4/80 gefärbt. Dargestellt ist die Expression von CD80 und CD86 der F4/80<sup>+</sup> Zellen.

Makrophagen gehören ebenfalls zu den Antigen-Präsentierenden-Zellen und können somit auch zu einer Aktivierung der T-Zellen führen. Abb. 3.14 zeigte jedoch eindeutig, dass sich die Expression von CD80 und CD86 der KO-Makrophagen nicht von der Expression der WT-Makrophagen unterscheidet. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass Makrophagen in diesem Model zu einer verstärkten Aktivierung der T-Zellen führten und die CK2-Defizienz spezifisch für DCs scheint.

### 3.14 Untersuchung der CD4<sup>+</sup> Thymus T-Zellpopulation

Wie bereits beschrieben, besitzen KO Mäuse eine deutlich geringere Population naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz sowie in den Darm-assoziierten lymphatischen Geweben (mesenteriale Lymphknoten). T-Zellen entwickeln sich aus lymphoiden Vorläuferzellen im Thymus, welchen sie als naive T-Zellen verlassen. Aus diesem Grund sollte hier untersucht werden, ob bereits im Thymus eine veränderte, z.B. größere Population der CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorliegt. Analog zu den CD4<sup>+</sup> T-Zellen entwickeln sich auch Tregs im Thymus. Daher sollte zusätzlich analysiert werden, ob in den KO Mäusen eine veränderte Entwicklung bzw. Population der Tregs vorliegt. Dies ist insofern von Interesse, da vorangegangene Versuche zeigten, dass KO DCs nach der Aktivierung nicht mehr durch Tregs supprimiert werden konnten. In der Maus dient der Transkriptionsfaktor FoxP3 als Marker für regulatorische T-Zellen und wurde hier zur Identifizierung der Tregs verwendet.



**Abb. 3.15: Untersuchung der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation im Thymus**

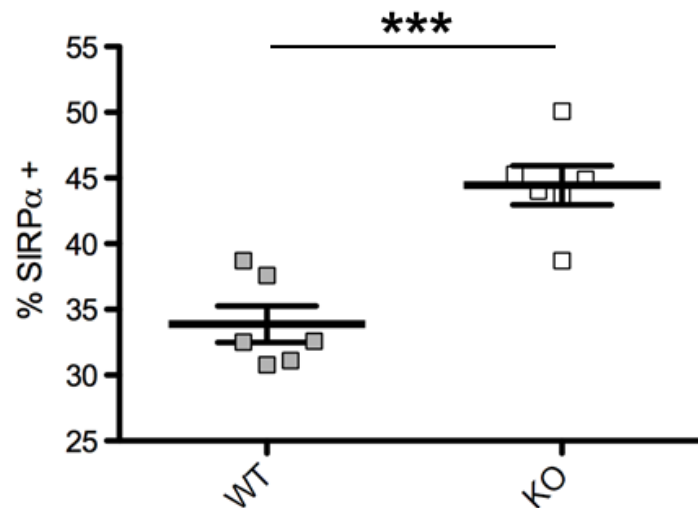
Die CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation aus dem Thymus von WT und KO Mäusen wurden auf Unterschiede bezüglich der prozentualen Verteilung untersucht. Darüber hinaus wurde die Treg-Population, anhand der FoxP3-Expression charakterisiert. Hierfür wurde der Thymus von WT und KO Mäusen steril entnommen, um daraus eine Zellsuspension herzustellen. Die Zellen wurden auf CD4 und CD8 gefärbt, anschließend fixiert und permeabilisiert, um intrazellulär die Expression von FoxP3 darzustellen. Dargestellt sind hier CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Thymozyten.

Bei der Untersuchung der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation im Thymus zeigte sich keine Veränderung in KO Mäusen verglichen mit WT Mäusen. Somit entwickelte sich im Thymus der KO Mäuse eine normale CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation, welche dann in der Peripherie, speziell im GALT, verstärkte Aktivierungssignale erhielt, woraus im Vergleich mit WT Mäusen eine

geringere naive CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation resultierte. Ein deutlicher Unterschied war jedoch in der Entwicklung der Tregs zu erkennen. Die Population der Tregs, hier durch die Expression von FoxP3 charakterisiert, ist im Thymus der KO Mäuse mehr als doppelt so groß, verglichen mit der korrespondierenden Population der WT Mäuse. Somit findet im Thymus der KO Mäuse eine normale Selektion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen statt, während jedoch die Differenzierung von Tregs wesentlich stärker ausgeprägt ist.

### 3.15 Untersuchung, der Treg-induzierenden DCs im Thymus

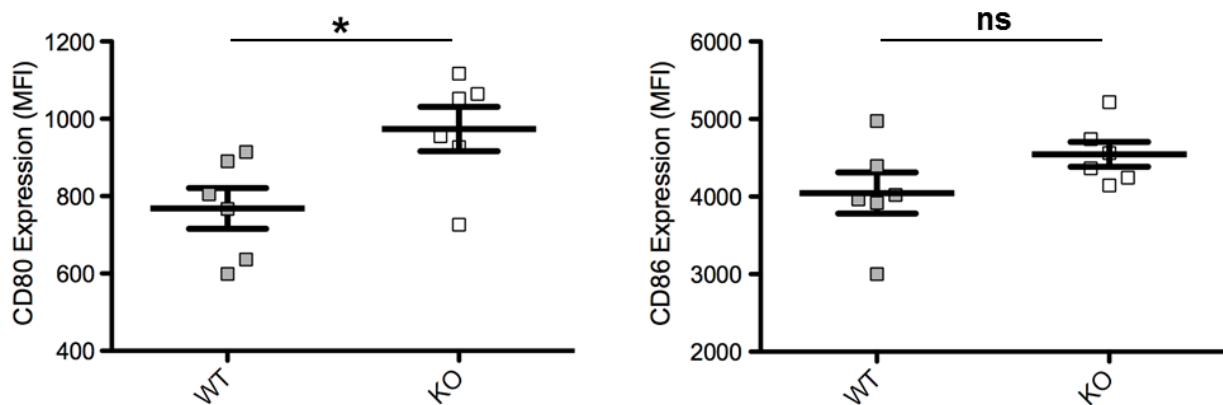
In *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine bestimmte DC-Subpopulation im Thymus besonders effektiv ist, die Differenzierung von Tregs zu induzieren<sup>51</sup>. Diese DC-Subpopulation kann durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD11c und SIRP $\alpha$  charakterisiert werden, wobei als negativ Marker CD45RA sowie CD8 $\alpha$  dienen. Im Vergleich mit anderen DC-Populationen im Thymus sind diese SIRP $\alpha$ <sup>+</sup> DCs stärker aktiviert in Bezug auf CD80 und CD86. Auf Grund der deutlich erhöhten Treg-Populationen in den KO Mäusen, sollte hier untersucht werden, ob in den KO Mäusen eine Veränderung in dieser SIRP $\alpha$ <sup>+</sup> DC-Population vorliegt.



**Abb. 3.16: Untersuchung der SIRP $\alpha$ <sup>+</sup> DC-Population im Thymus**

Die Thymi von WT und KO Mäusen wurden unter sterilen Bedingungen entnommen um DCs unter Verwendung von DNaseII (0,1mg/ml) und KollagenaseI (1mg/ml) zu gewinnen. Anschließend wurden die isolierten Zellen für die FACS-Analyse vorbereitet. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der SIRP $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD45RA<sup>-</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup> Zellen

Dieser Versuch zeigte deutlich, dass in den KO Mäusen der Anteil der Treg-induzierenden  $\text{SIRP}\alpha^+$  DCs stark erhöht ist und somit eine mögliche Erklärung für die stark erhöhte Zahl der Tregs darstellt. Ein Merkmal dieser beschriebenen DC-Subpopulation ist die verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob neben der vergrößerten Population auch eine veränderte Expression dieser Moleküle in KO Mäusen vorliegt.



**Abb. 3.17: Untersuchung der Expression kostimulatorischer Moleküle der  $\text{SIRP}\alpha^+$  DCs**

Die  $\text{SIRP}\alpha^+$  DCs wurden wie in Abb.16 beschrieben gewonnen und mittels FACS-Analyse auf die Expression von CD80 und CD86 untersucht. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der CD80 und CD86 Expression der  $\text{SIRP}\alpha^+$  DCs.

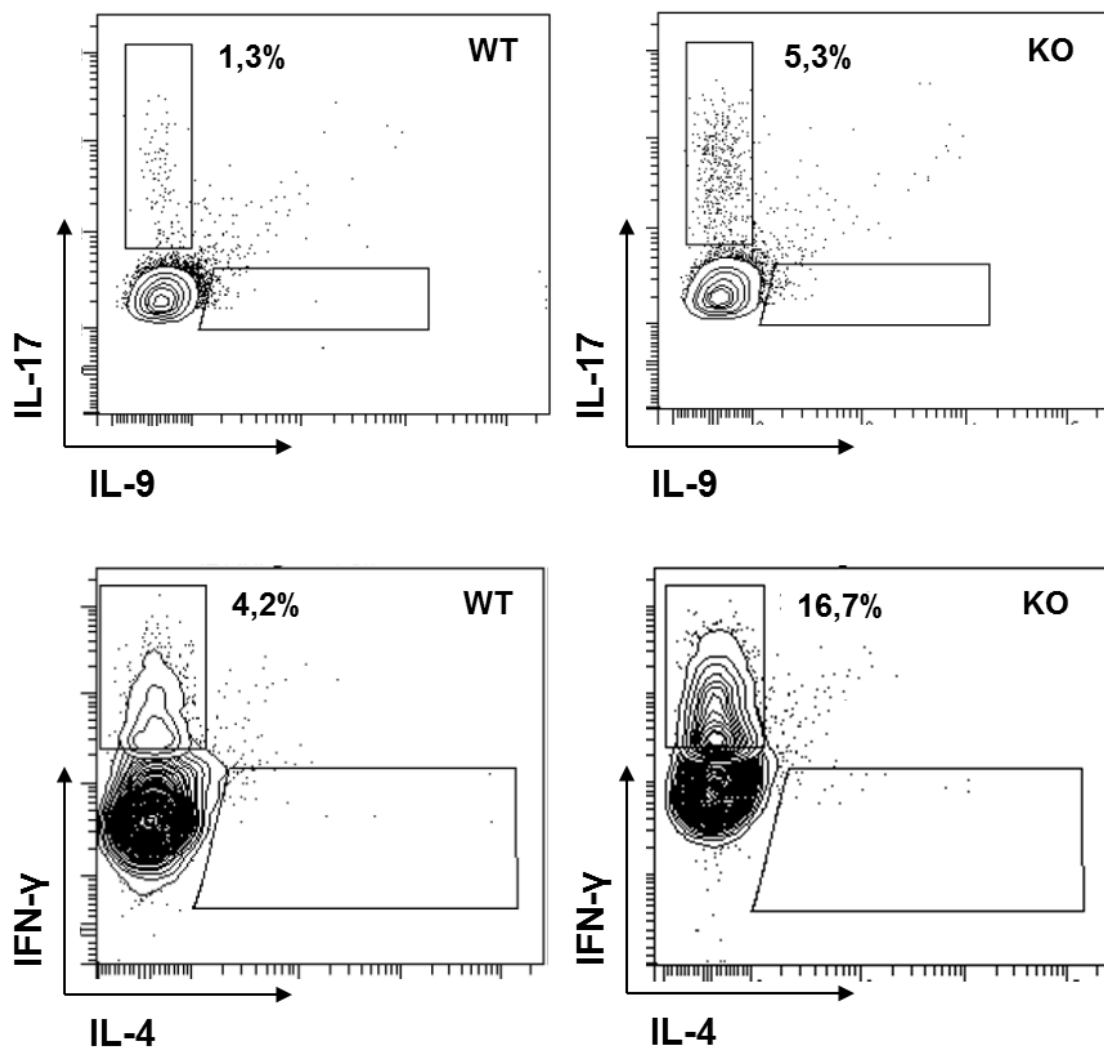
Im Thymus der KO Mäusen ist nicht nur die  $\text{SIRP}\alpha^+$  DC-Population erhöht, sondern auch, wie Abb. 3.17 zeigt, die Expression von CD80. Wie bereits bei den untersuchten KO DC-Subpopulationen im GALT ist auch im Thymus CD86 nicht verstärkt exprimiert.



---

### 3.16 Analyse des Zytokinprofils CD4<sup>+</sup> T-Zellen

DCs sind in der Lage, durch die Expression verschiedener Zytokine, entscheidend die Qualität der T-Helferzellendifferenzierung zu beeinflussen. Die nachfolgend beschriebenen Analysen sollten zeigen, inwieweit die Defizienz der CK2 in DCs nicht nur zu einer Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt, sondern möglicherweise eine Differenzierung in einen bestimmten T-Helferzelltyp favorisiert. Hierzu wurden die Leitzytokine der bekannten T-Helferpopulationen, IFN- $\gamma$  (Th1), IL-4 (Th2), IL-9 (Th9), sowie IL-17 (Th17) untersucht. Zunächst wurden Milzzellsuspensionen aus KO und WT Mäusen hergestellt und diese mittels Kalziumionophor Ionomycin/PMA stimuliert. Anschließend wurden die Zellen zunächst auf CD4, zur Charakterisierung der T-Zellen gefärbt, und anschließend mittels Intrazellulärfärbung der Zytokine, IL-4, IL-9, IL-17 und IFN- $\gamma$  deren Fähigkeit getestet, die jeweiligen T-Helferzell-spezifischen Zytokine zu exprimieren.



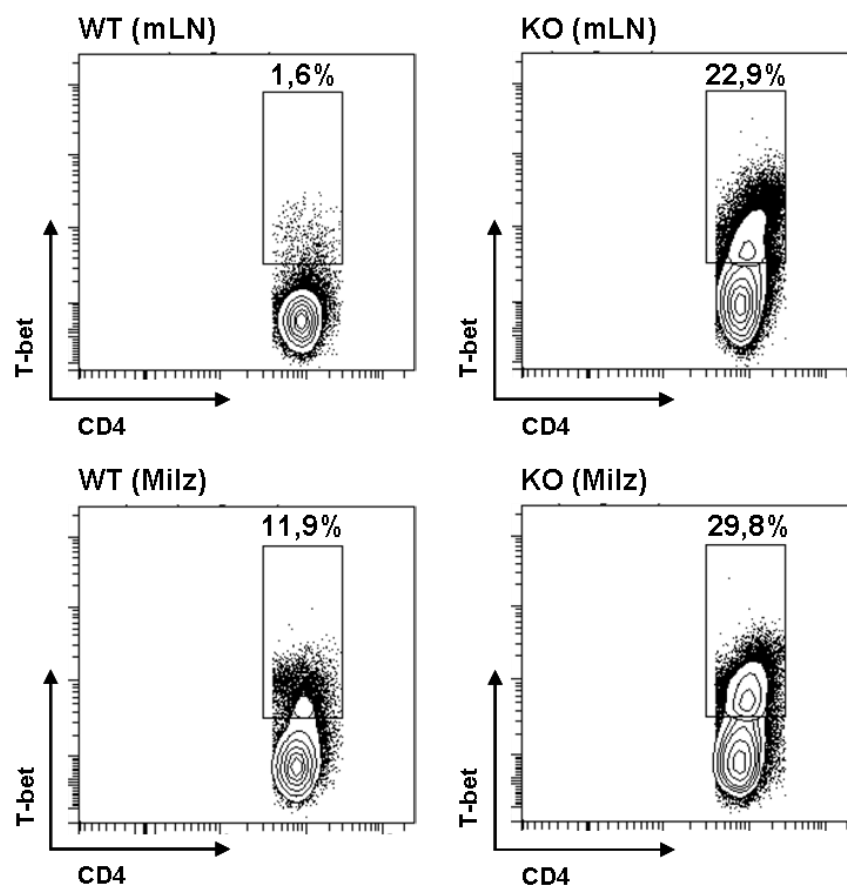
**Abb. 3.18: Stimulation von Milzzellen zur Analyse des Zytokinprofils CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Milzen von WT und KO Tieren wurden steril entnommen, um daraus eine Zellsuspension herzustellen.  $2 \times 10^5$  Milzzellen wurden mit Ionomycin und PMA für 5h, in Gegenwart von BrefeldinA stimuliert, oder unstimuliert bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurde, sowohl die Oberfläche der Zellen auf CD4 gefärbt, als auch intrazellulär die Zytokine IL-17, IL-9, IL-4 und IFN-γ. Logarithmisch dargestellt sind die CD4<sup>+</sup> Zytokinproduzenten.

Bei der vergleichenden Analyse des Zytokinprofils zwischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus WT und KO Mäusen konnte für die Leitzytokine von Th2-Zellen (IL-4) und Th9-Zellen (IL-9) kein Unterschied beobachtet werden. Die Th17-spezifischen und Th1-spezifischen Zytokine IL-17 und insbesondere IFN-γ waren jedoch in CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus KO Mäusen deutlich erhöht. Dies bestätigt zum einen, dass nicht nur weniger naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den KO Mäusen vorhanden waren, sondern zeigte auch deutlich, dass eine DC-spezifische Defizienz der CK2 zu einer verstärkten Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1- und Th17-Zellen führt.

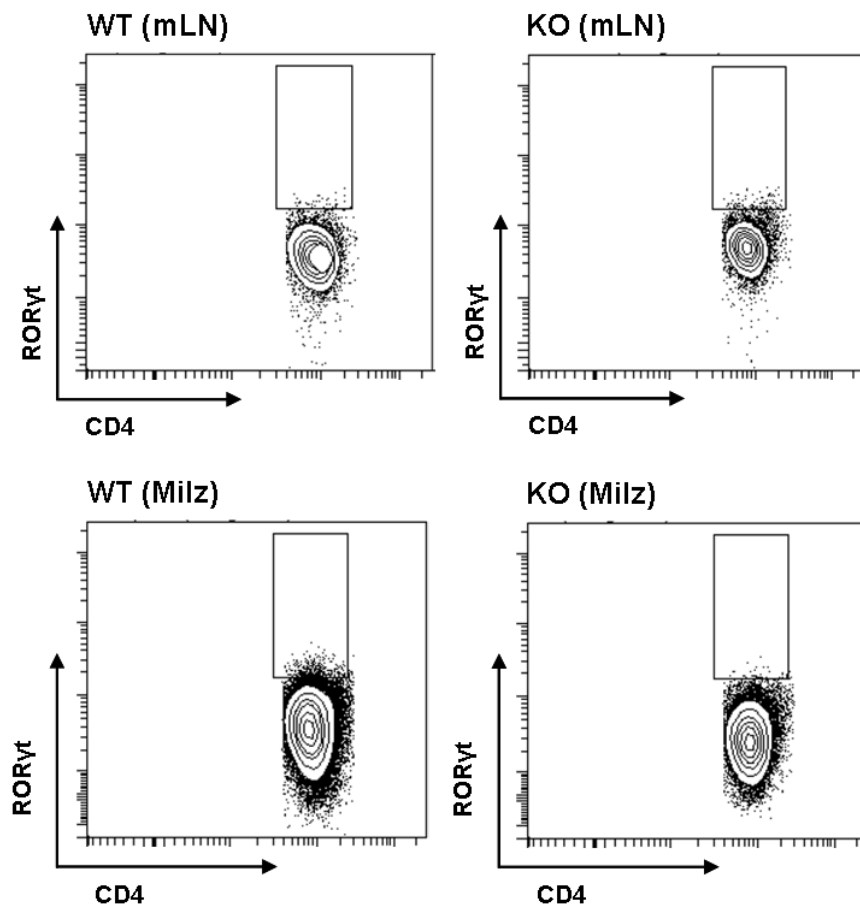
### 3.17 Expressionsanalyse der Transkriptionsfaktoren T-bet und ROR $\gamma$ t der CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Auf Grund der erhöhten Zytokine IL-17 und IFN- $\gamma$  war zu erkennen, dass in den KO Mäusen eine verstärkte Differenzierung der T-Zellen in Th1- und Th17-Zellen stattfand. Aus diesem Grund sollte konsequenterweise analysiert werden, ob die Transkriptionsfaktoren, welche für die Th1- und Th17-Entwicklung verantwortlich sind, ebenfalls in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt exprimiert wurden. Hierfür wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz und dem GALT (mesenterialen Lymphknoten) auf die Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet und ROR $\gamma$ t untersucht.



**Abb. 3.19: Expressionsanalyse des Th-1 Transkriptionsfaktors T-bet in CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Je  $2 \times 10^5$  KO, bzw. WT Zellen aus der Milz, oder aus mesenterialen Lymphknoten wurden in Gegenwart von Brefeldin-A für 5h mit Ionomycin (1 $\mu$ M) und PMA (20ng/ml) stimuliert. Anschließend wurde die Zelloberfläche, zur Charakterisierung der T-Zellen, auf CD4 gefärbt. Für die intrazelluläre Darstellung der Transkriptionsfaktoren wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und anschließend intrazellulär auf T-bet gefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels Durchflusszytometrie.



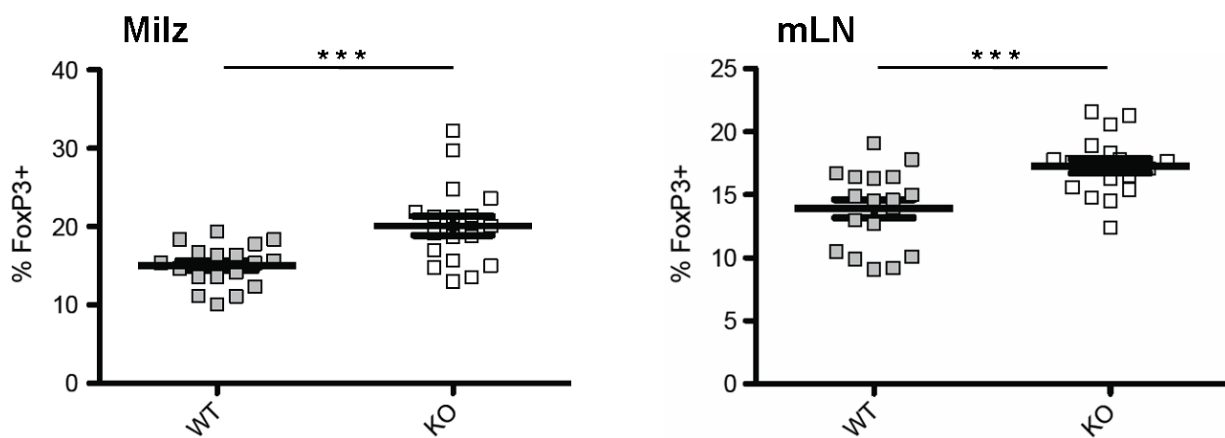
**Abb. 3.20: Expressionsanalyse des Th17 Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t in CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Die Isolation und Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus dem mesenterialen Lymphknoten erfolgte genau wie in Abb. 3.14 beschrieben.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Expression des Th1-Transkriptionsfaktors T-bet in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus KO Mäusen stark erhöht war. Der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t, zur Charakterisierung der Th17-Zellen, war in den KO Mäusen jedoch nicht verstärkt exprimiert. Eine gesteigerte Produktion von IL-17 muss somit nicht mit einer erhöhten ROR $\gamma$ t Expression korrelieren. Zusammengenommen zeigten die CD4<sup>+</sup> T-Zellen der KO Mäuse eine deutlich stärkere Th1-Differenzierung, die sich analog zu der Anzahl aktivierter T-zellen in der Milz und dem GALT nicht unterschied.

### 3.18 Analyse der regulatorischen T-Zellpopulation

Regulatorische T-Zellen sind in der Lage autoreaktive T-Zellen in der Peripherie zu kontrollieren und, insbesondere im GALT, die Toleranz aufrecht zu erhalten. Da sich die CK2-Defizienz in DCs in einer stärkeren T-Zellaktivierung und T-Zelldifferenzierung (Th1, Th17) widerspiegelt, sollte untersucht werden, ob in den KO Mäusen eine Veränderung in der regulatorischen T-Zellpopulation zu erkennen ist. Tregs können in der Maus anhand der Expression von FoxP3 charakterisiert werden, so dass hier die Foxp3<sup>+</sup> Population innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, sowohl aus der Milz, als auch aus dem GALT (mesenteriale Lymphknoten) untersucht wurde.



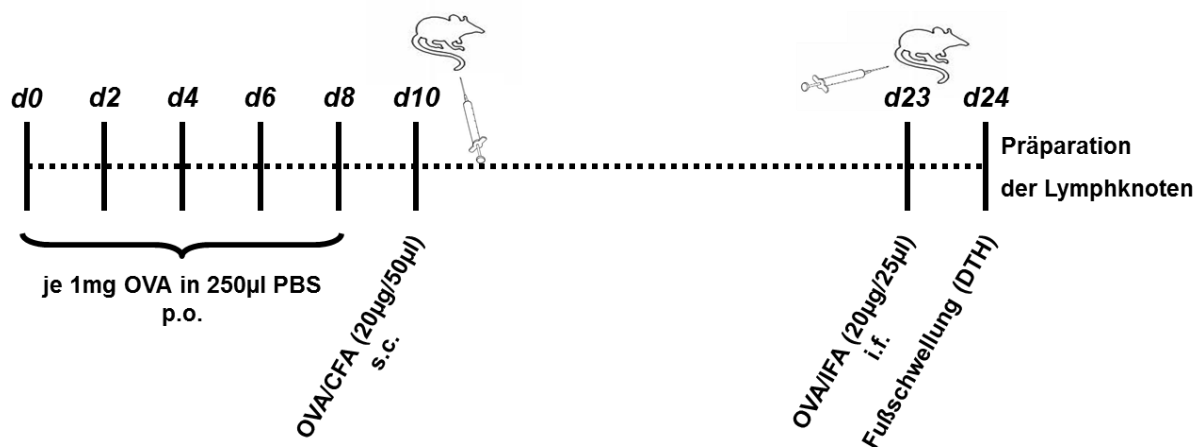
**Abb. 3.21: Darstellung der Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz und mesenterialen Lymphknoten**

Aus Milzen und mesenterialen Lymphknoten, von sowohl WT, als auch KO Mäusen, wurden Zellsuspensionen hergestellt. Je  $5 \times 10^5$  Zellen wurden, zu Charakterisierung der T-Zellen auf CD4 gefärbt und anschließend, zur Darstellung der Tregs, intrazellulär auf FoxP3 gefärbt. Untersucht wurden Tiere verschiedenen Alters (5-20 Wochen).

Bei der Analyse der Treg-Population der Milz und dem GALT (mesenteriale Lymphknoten) wurde deutlich, dass in KO Mäusen die Population der Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen erhöht war. Dies steht im Einklang mit der erhöhten Treg-Population im Thymus der KO Mäuse. Es kann also angenommen werden, dass aufgrund der erhöhten Treg-Differenzierung im Thymus der KO Mäuse mehr Tregs in die verschiedenen Organe auswandern.

### 3.19 Orale Toleranz als *in vivo* Model

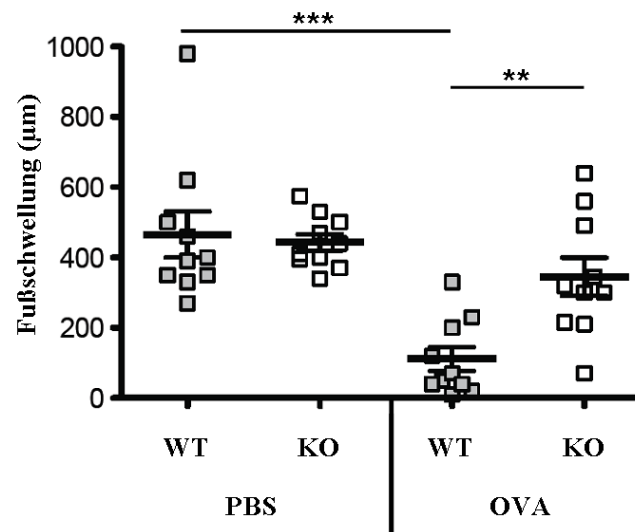
Die orale Toleranz ist klassisch definiert als spezifische Unterdrückung einer zellulären oder humoralen Immunantwort gegen ein Antigen, welches zuvor oral verabreicht wurde. Bestimmte DC-Populationen nehmen das verabreichte Antigen auf und präsentieren es in den mesenterialen Lymphknoten naiven T-Zellen. Hierbei sind die DCs in der Lage, antigenspezifische regulatorische T-Zellen zu induzieren, welche in den Darm auswandern und hier die Toleranz gegenüber dem Antigen gewährleisten. In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass DCs aus dem GALT (mesenteriale Lymphknoten) der KO Mäuse einen stärker aktivierten Phänotyp zeigten und die Differenzierung von Th1-Zellen und Th17-Zellen begünstigen. Somit ist die orale Toleranz ein geeignetes Model um zu überprüfen, welchen Einfluss der aktivierte Phänotyp der DCs *in vivo* auf die Immunregulation besitzt. Nachfolgend (Abb. 3.22) ist der Versuchsablauf skizziert. Verwendet wurde hier ein Model der oralen Toleranz bei dem niedrige Dosen des Antigens wiederholt verabreicht wurden.



**Abb. 3.22: Versuchsprotokoll „orale Toleranz“**

Als oral verabreichtes Antigen wurde hier Ovalbumin verwendet. Ovalbumin wurde in PBS gelöst (1mg/250µl) und jeden 2. Tag, insgesamt 5 Mal, oral verabreicht (Schlundsonde). Anschließend erfolgte die Immunisierung mit Ovalbumin in CFA (Complete Freund's Adjuvant) intra peritoneal (i.p.). An Tag 23 des Versuchs wurde erneut mit Ovalbumin in Incomplete Freund's Adjuvant, in die Fußballen (i.f.) immunisiert, um eine DTH (delayed type hypersensitivity) hervorzurufen. Tiere der Kontrollgruppen erhielten anstelle des Antigens, reines PBS. Als Maß der DTH wurde nach 24h die Fußschwellung der Mäuse gemessen.

### 3.19.1 Orale Toleranz: Bestimmung der Fußschwellung als Maß der DTH



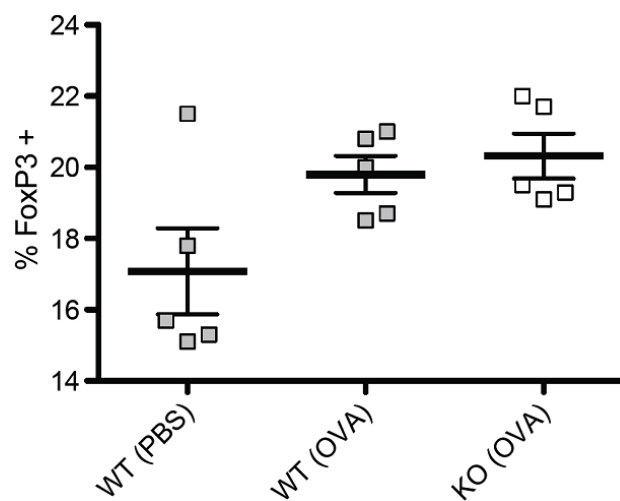
**Abb. 3.23: Verlauf der DTH**

An Tag 23 des laufenden Versuchs wurde eine DTH induziert, indem OVA/IFA (20µg/25µl) in einen Fußballen der Mäuse injiziert wurde. In den anderen Fußballen wurde PBS/IFA injiziert. Nach 24h wurde die Fußschwellung der Mäuse gemessen. Dargestellt ist die Differenz der Fußdicke (Schwellung) zwischen den beiden Füßen.

Der Verlauf der DTH zeigt eindrucksvoll, dass sich in den KO Mäusen keine orale Toleranz gegenüber Ovalbumin etablieren lässt. In den WT Mäusen, welche kein Ovalbumin oral appliziert bekommen haben und somit keine orale Toleranz ausgebildet haben, ist eine deutliche Fußschwellung zu erkennen, was eine starke adaptive Immunreaktion gegen das Ovalbumin widerspiegelt. In den tolerisierten WT Mäusen hingegen, ist die Fußschwellung deutlich geringer. Dies zeigte, dass die orale Toleranz erfolgreich etabliert wurde und eine geringe Immunreaktion gegen Ovalbumin zur Folge hatte. Bei den KO Mäusen, welche kein Ovalbumin verabreicht bekommen haben, ist ebenfalls eine starke Immunreaktion gemessen an der Fußschwellung festzustellen. Es ist aber deutlich zu erkennen, dass sich in den „tolerisierten“ KO Mäusen keine Toleranz induzieren lässt. Die hier gemessene Fußschwellung und die damit verbundene Immunreaktion waren nahezu gleich stark mit der Kontrollgruppe. Dieser *in vivo* Versuch zeigte deutlich, dass die CK2 in DCs essentiell für die Immunregulation, insbesondere für die Aufrechterhaltung und Induktion von Toleranz ist.

### 3.19.2 Orale Toleranz: Untersuchung der regulatorischen T-Zellpopulation

Ein bekannter Mechanismus für die Ausbildung der oralen Toleranz ist die verstärkte Differenzierung von Tregs aus  $CD4^+$  T-Zellen. Diese Tregs werden in den mesenterialen Lymphknoten differenziert und wandern anschließend in die Lamina propria des Darms aus. Hier sind die Tregs in der Lage, Immunreaktionen zu kontrollieren und Toleranz gegenüber einem Antigen aufrechtzuerhalten. Aus diesem Grund sollte in den drainierenden Lymphknoten die Treg-Population bestimmt werden, um zu überprüfen, ob in den oral tolerisierten Tieren eine verstärkte Treg-Differenzierung stattgefunden hat.



**Abb. 3.24: Untersuchung der Treg-Population in drainierenden Lymphknoten**

Für die Untersuchung der Treg-Population ( $FoxP3^+ CD4^+$ ) wurde aus drainierenden Lymphknoten der oral tolerisierten, sowie der Kontrolltiere Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Oberfläche von jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen wurden zunächst auf  $CD4$  gefärbt und anschließend erfolgte, intrazellulär die Färbung auf den Transkriptionsfaktor  $FoxP3$ . Dargestellt ist die  $FoxP3^+$  Population innerhalb der  $CD4^+$  T-Zellen.

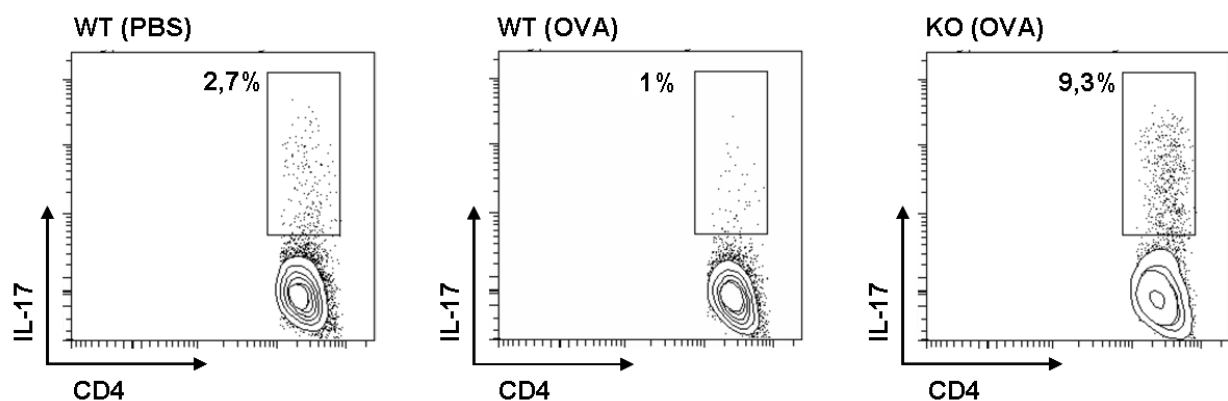
Aus Abbildung 3.24 geht hervor, dass innerhalb der Wildtyp-Gruppe nach Fütterung mit Ovalbumin eine erhöhte Zahl an  $FoxP3^+$  T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten zu beobachten war. Für dieses *in vivo* Modell ist bekannt, dass es hauptsächlich auf der Differenzierung von Tregs beruht. Somit kann die an der DTH gemessene, ausgebildete Toleranz mit der erhöhten Population an Tregs erklärt werden. Auch in der KO Gruppe wurde nach Fütterung mit Ovalbumin eine größere Population von Tregs beobachtet. Da es sich hier um einen ersten durchgeführten Versuch der oralen Toleranz handelte, und auf Grund einer geringen Anzahl zur Verfügung stehenden KO Mäusen, wurde hier auf die KO



PBS Gruppe verzichtet. Jedoch zeigt dieser Versuch, dass die Treg-Population, welche in WT Mäusen ausreichend ist um eine Toleranz erfolgreich zu etablieren, in KO Mäusen nicht ausreichend ist. Als Erklärung für diesen Befund könnte die verminderte Supprimierbarkeit der KO DCs (siehe 3.8) dienen.

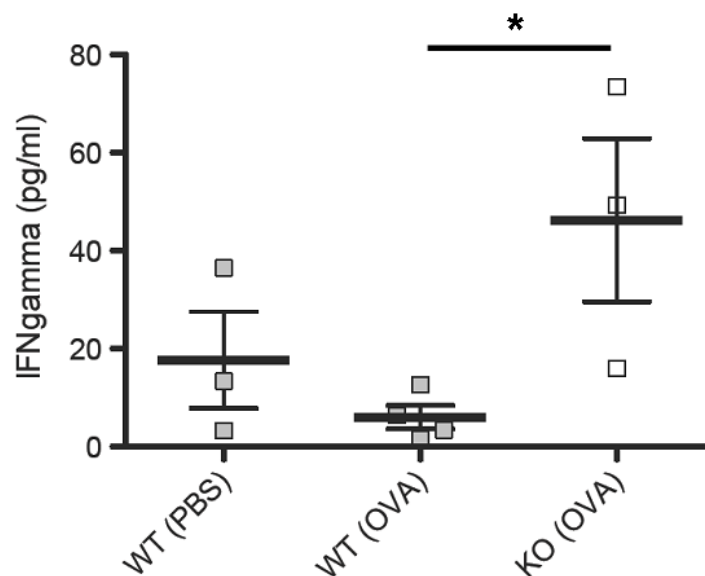
### 3.19.3 Orale Toleranz: Analyse der Th1- und Th17-Differenzierung in drainierenden Lymphknoten

Es ist bekannt, dass durch Induktion einer oralen Toleranz, sowohl Th1-, als auch Th17-Antworten unterdrückt werden konnten (Jean Pierre S. Peron, oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall inflammation in the central nervous system of eae mice). Da in dieser Arbeit, am Beispiel der DTH gezeigt wurde, dass KO Mäuse keine orale Toleranz ausbilden konnten, sollte hier untersucht werden, ob in den Ovalbumin gefütterten KO Mäusen auch eine verstärkte Th1- und Th17-Differenzierung stattfand. Hierfür wurden Zellen aus den drainierenden Lymphknoten stimuliert und die Produktion von IL-17 (Th17), sowie von IFN- $\gamma$  (Th1) bestimmt. Zusätzlich sollten wiederum die Transkriptionsfaktoren der Th1- (T-bet) und Th17-Differenzierung (ROR $\gamma$ t) untersucht werden. Die Analyse der Transkriptionsfaktoren ist darüber hinaus von Interesse, da T-bet/ ROR $\gamma$ t doppelt positive CD4<sup>+</sup> T-Zellen als pathogene T-Zellpopulation gelten.



**Abb. 3.25: Intrazelluläre Darstellung der IL-17 Produktion, stimulierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

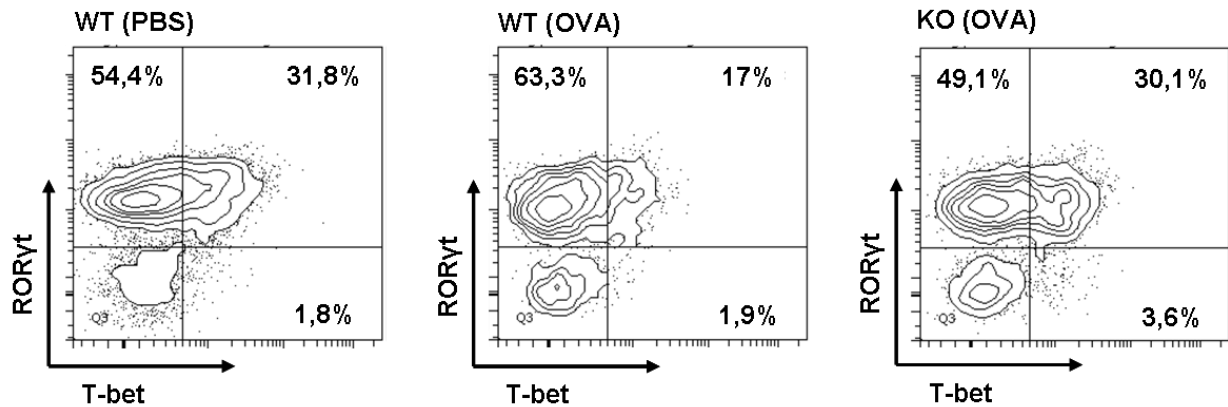
$2 \times 10^5$  Zellen aus drainierenden Lymphknoten wurden in Gegenwart von Brefeldin-A für 5h mit Ionomycin (1 $\mu$ M) und PMA (20ng/ml) stimuliert. Zur Darstellung der T-Zellen wurde die Zelloberfläche auf CD4 gefärbt, anschließend erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen, um intrazellulär das Zytokin IL-17 nachweisen zu können. Die Auswertung erfolgte mittels FACS-Analyse.



**Abb. 3.26: IFN- $\gamma$  Produktion stimulierter Zellen aus drainierenden Lymphknoten**

$2 \times 10^5$  Zellen aus den drainierenden Lymphknoten wurden für 3 Tage mit Ovalbumin (100 $\mu$ g/ml) stimuliert. An d3 wurde der Kulturüberstand gewonnen und mittels ELISA (siehe Material & Methode) auf die Produktion von IFN- $\gamma$  untersucht.

Für die Untersuchung der Th1- und Th17-Effektorfunktionen wurden 2 verschiedene Arten der Zellstimulation gewählt. Für die Darstellung der IL-17 Produzenten wurde mit Ionomycin und PMA ein starker Zellstimulus gewählt, um die Zytokinproduktion intrazellulär darstellen zu können. Um zu zeigen, dass die etablierte orale Toleranz antigenspezifisch ist, wurden Zellen des drainierenden Lymphknotens in Gegenwart des oral applizierten Ovalbumins kultiviert. Nach drei Tagen Stimulation wurde der Kulturüberstand auf IFN- $\gamma$  untersucht. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der DTH, ist in tolerisierten WT Mäusen, der Anteil von sowohl CD4<sup>+</sup> IL-17 Produzenten (Th17-Zellen), als auch von IFN- $\gamma$ -Produzenten (Th1-Zellen) im Vergleich mit den Kontrolltieren (PBS) geringer. Dies verdeutlicht eindrucksvoll, dass in WT Mäusen durch orale Toleranz Th1- und Th17-Effektorfunktionen unterdrückt werden können und das die ausgebildete Toleranz spezifisch für das gefütterte Ovalbumin ist. In KO Mäusen hingegen konnte wiederum keine abgeschwächte Th1- und Th17-Effektorfunktion beobachtet werden.



**Abb. 3.27: Analyse der Transkriptionsfaktoren ROR $\gamma$ t und T-bet in CD4<sup>+</sup> T-Zellen der drainierenden Lymphknoten**

Drainierende Lymphknoten der PBS, oder Ovalbumin gefütterten WT, bzw KO Mäuse wurden steril entnommen, um daraus eine Zellsuspension herzustellen.  $2 \times 10^5$  Zellen wurden in  $200\mu\text{l}$  TM + 5%FCS in einer 96-Well-Rundbodenplatte mit Ionomycin ( $1\mu\text{M}$ ), sowie PMA ( $20\text{ng/ml}$ ) für 5h in Gegenwart von Brefeldin-A inkubiert. Anschließend wurde die Zelloberfläche auf CD4 gefärbt, sowie intrazellulär die Transkriptionsfaktoren ROR $\gamma$ t und T-bet. Dargestellt ist die Expression von ROR $\gamma$ t und T-bet der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Die Analyse der Th1- und Th17-Transkriptionsfaktoren, T-bet und ROR $\gamma$ t steht in Einklang mit den zuvor gezeigten Daten der IL-17- und IFN- $\gamma$ -Produzenten (Abb. 3.25). Insbesondere die als pathogen geltende T-bet/ ROR $\gamma$ t doppelt positive CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation kann in WT Mäusen durch orale Fütterung von Ovalbumin erfolgreich unterdrückt werden. In KO Mäusen konnte dies jedoch erneut nicht beobachtet werden. Zudem lässt die T-bet/ ROR $\gamma$ t doppelt positive T-Zellpopulation den Schluss zu, dass diese Zellen auch beide Zytokine, IL-17 und IFN- $\gamma$ , gleichzeitig bilden können.

Dies verdeutlicht, dass die DC-spezifische Defizienz in der CK2 zwar zu einer Induktion regulatorische T-Zellen nach oraler Gabe des Antigens führte, die effektive Ausbildung der oralen Toleranz aber nicht zuletzt durch die verstärkte Differenzierung von Th1 und Th17 Zellen unterbunden wurde.



---

## 4. Diskussion

DCs repräsentieren das Bindeglied zwischen dem angeborenen Immunsystem und dem erworbenen Immunsystem. Als professionelle Antigenpräsentierende Zellen leiten sie eine erworbene Immunantwort ein, indem sie Antigen aufnehmen, prozessieren und in Kombination mit MHC-II-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentieren<sup>52</sup>. CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einem entsprechenden T-Zell-Rezeptor erkennen das so präsentierte Antigen. Für eine vollständige Aktivierung benötigen T-Zellen noch ein zweites kostimulatorisches Signal, welches von DCs in Form der Moleküle CD80 und CD86 bereitgestellt wird und mit CD28 der T-Zellen interagiert<sup>53</sup>. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Deletion einer funktionellen CK2 in DCs zu einer erhöhten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD80 führte. Diese erhöhte Expression konnte sowohl bei DCs, die *in vitro* differenziert wurden, (BMDCs) beobachtet werden, als auch bei DCs, die *ex vivo* aus dem GALT (mesenterialen Lymphknoten) isoliert wurden. Interessanterweise zeigte die CK2-Defizienz in DCs aus inguinalen- und poplitealen Lymphknoten keinen Einfluss auf die Expression dieser Moleküle. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die CK2 in den Darm-assoziierten lymphatischen Geweben (GALT) für die Homöostase von entscheidender Rolle ist, während DCs in der Peripherie über weitere Signalwege reguliert werden. Für DCs aus dem GALT ist bekannt, dass der Wnt-Signalweg entscheidend ist, um eine Toleranz aufrechtzuerhalten<sup>44</sup>. Die Aktivierung dieses Signalweges führt zu einer Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin, welches daraufhin in den Zellkern gelangt und hier zu einer Lef/Tcf-abhängigen Transkription von Zielgenen führt (siehe Seite 13, Abb.2). So konnte gezeigt werden, dass im Unterschied zu DCs aus der Peripherie der Wnt-Signalweg in DCs aus dem GALT konstitutiv aktiv ist<sup>44</sup>. Da CK2 in diesem Wnt-Signalweg zu einer Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin beiträgt, kann die Deletion der CK2-Funktion zu einer verringerten Expression der Lef/Tcf-abhängigen Zielgene führen und so die Homöostase der DCs im GALT stören. Darüber hinaus ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B eine entscheidende Rolle in der Aktivierung, von sowohl murinen<sup>54</sup> als auch von humanen DCs spielt<sup>55,56</sup>. Durch Bindung der NF- $\kappa$ B Untereinheiten p50 und p65 an die DNA wird sowohl die Expression der kostimulatorischen Moleküle (CD80, CD86) verstärkt, als auch von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-12. Die Deletion der CK2 in DCs aus dem GALT führte zu einer erhöhten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie zu einer verstärkten Genexpression von *Il-1 $\beta$*  und *Il-6* in BMDCs. Eine mögliche Erklärung für den stärker aktivierten Phänotyp der CK2-deletierten DCs kann somit eine erhöhte NF- $\kappa$ B

Aktivität liefern. Diese Annahme beruht auch auf der kürzlich gezeigten Interaktion der CK2 mit dem intrazellulären Rezeptor RIG-I (Retinoic acid inducible gene I). In Abwesenheit von Gefahrensignalen wird der intrazelluläre Rezeptor RIG-I durch CK2 phosphoryliert, wodurch RIG-I inaktiv in der Zelle vorliegt<sup>57</sup>. Liegt RIG-I jedoch dephosphoryliert vor, so führt dies zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B und einer nachfolgenden Transkription von NF- $\kappa$ B abhängigen Genen<sup>58</sup>. Eine CK2-Defizienz in DCs und die damit einhergehende dephosphorylierung von RIG-I, kann somit zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen und in einem stärker aktivierten Phänotyp der CK2-defizienten DCs resultieren.

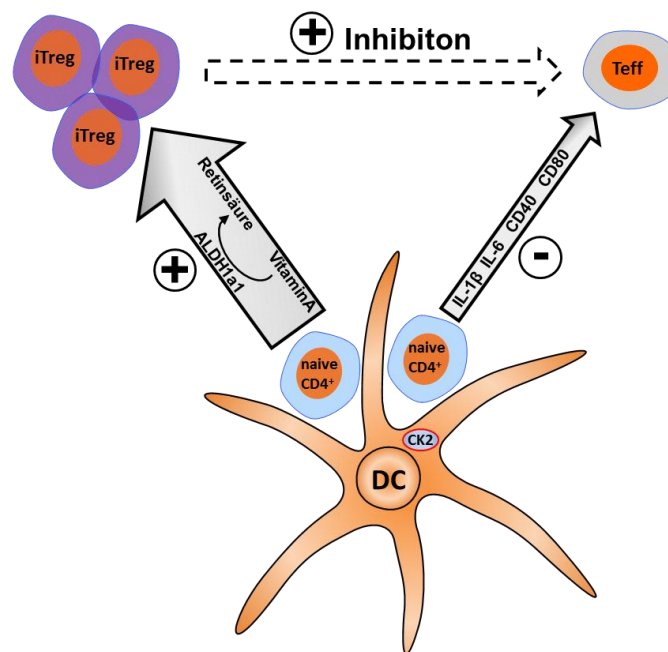
Wie bereits beschrieben, stellen DCs das Bindeglied zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem dar und aktivieren CD4<sup>+</sup> T-Zellen, indem sie Antigen in Kombination mit MHC-Klasse-II Molekülen präsentieren und zusätzlich kostimulatorische Moleküle über CD80, CD86 und CD40 bereitstellen. Diese Merkmale sind bei DCs aus dem GALT der CK2-deletierten Tiere, bereits in Abwesenheit von Gefahrensignalen (z.B. PAMPs) ausgeprägt. Als DC-Subpopulation, mit dem am stärksten ausgeprägten Phänotyp, konnte hier die CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>++</sup> CD11b<sup>+</sup> DC-Population identifiziert werden. Diese DC-Subpopulation ist als „migratory DC“ beschrieben, welche darauf spezialisiert ist, Antigen aus dem Darmlumen aufzunehmen und zu dem drainierenden Lymphknoten (mesenterialer Lymphknoten) zu wandern<sup>59</sup>, um hier CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren. Da diese CK2-defiziente DC-Subpopulation, verglichen mit der WT DC-Subpopulation, bereits im Zustand der Homöostase CD80 und CD40 verstärkt exprimierten, spiegelte sich dieser stärker aktivierte Phänotyp auch auf der Ebene der T-Zellen wider. Naive T-Zellen exprimieren das Adhäsionsmolekül CD62L (L-Selectin) auf ihrer Oberfläche<sup>60</sup> und können so, über Bindung an HEV (high endothelial venules) der mesenterialen- und peripheren Lymphknoten, in diese gelangen<sup>61,62</sup>. Nach ihrer Aktivierung verlieren CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Expression von CD62L, so dass dieses Oberflächenmolekül für die Charakterisierung der naiven CD4<sup>+</sup> T-Zell Population geeignet ist. Tatsächlich fand sich in den CK2-deletierten Tieren eine geringere Population an naiven (CD62L<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Im Gegensatz zu dem veränderten DC-Phänotyp war diese Beobachtung nicht nur auf den GALT (mesenterialer Lymphknoten) beschränkt, sondern konnte auch in der Milz beobachtet werden. Das bedeutet, dass in den CK2-deletierten Tieren T-Zellen im drainierenden Lymphknoten des GALTs auf die CD11b<sup>+</sup> DCs treffen und durch die verstärkt exprimierten kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD80 aktiviert werden. Darüber hinaus sind DCs in der Lage, nicht nur naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren, sondern auch durch die Bildung bestimmter Zytokine die Differenzierung in bestimmte T-Helferpopulationen einzuleiten. So wird die Differenzierung von Th17-Zellen durch die

Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21, IL-23 und TGF- $\beta$  induziert.<sup>63,64,65</sup> In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus CK2-deletierten Tieren, nach deren Stimulation *in vitro* verstärkt die Zytokine IFN- $\gamma$  sowie IL-17 produzieren, woraus eine bevorzugte Differenzierung in Th1- und Th17-Zellen abgeleitet werden kann. Die erhöhte Th17-Differenzierung kann mit der Beobachtung, dass DCs aus CK2-deletierten Tieren verstärkt IL-1 $\beta$  und IL-6 bilden, erklärt werden. Da DCs aus dem GALT den aktivierten Phänotyp auf Grund der CK2-Defizienz besitzen, findet die CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung in einer Umgebung reich an TGF- $\beta$  statt, so dass alle Bedingungen für eine verstärkte Th17-Differenzierung, durch Induktion des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t, gewährleistet sind<sup>25</sup>. Obwohl in den CK2-deletierten Tieren keine erhöhte ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> T-Zellpopulation identifiziert werden konnte, lässt die erhöhte Zahl der IL-17 produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Schlussfolgerung zu, dass hier eine stärkere Th17-Differenzierung vorliegt. Ebenfalls zu einer erhöhten Frequenz der IL-17 Produzenten trägt die beobachtete, verstärkte IL-1 $\beta$  Expression in den CK2-defizienten DCs bei, wodurch die IL-17 Produktion durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt werden kann<sup>66</sup>. Darüber hinaus ist bekannt, dass DCs durch Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalweges verstärkt die Th1 und Th17 Differenzierung induzieren<sup>67</sup>. Wie bereits beschrieben, könnte die CK2-Defizienz in DCs aus den mesenterialen Lymphknoten zu einer unkontrollierten Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen und so, z.B. eine verstärkte IL-12 Produktion zur Folge haben. Das Zytokin IL-12 ist entscheidend an der Th1 Differenzierung beteiligt, indem es STAT4 aktiviert<sup>68,69</sup>. STAT4 kann daraufhin direkt am Promotor für *Ifn- $\gamma$*  binden und so dessen Transkription einleiten<sup>70</sup>, was zu der beobachteten erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion in den KO Tieren führen kann. Neben der starken IFN- $\gamma$  Produktion, konnte in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls eine deutlich erhöhte T-bet<sup>+</sup> Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden. Dies weist auf eine deutlich bevorzugte Differenzierung der naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den CK2-deletierten Tieren zu Th1-Zellen hin. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit durch Genexpressionanalysen gezeigt werden, dass in CK2-defizienten DCs, die aus Knochenmark differenziert wurden (BMDCs), das Enzym Aldh1a1 schwächer transkribiert wird als in WT BMDCs. Aldh1a1 ist ein Vitamin-A metabolisierendes Enzym, das die Bildung von Retinsäure (RA) katalysiert. RA ist in der Lage die Differenzierung von Th1 Zellen zu verhindern<sup>71</sup>, indem z.B. der Transkriptionsfaktor T-bet geringer transkribiert wird. Eine geringere Aldh1a1-Funktion kann somit ebenfalls die Th1 Differenzierung fördern. Auf der anderen Seite sind DCs in Gegenwart von RA in der Lage die Differenzierung von Tregs aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu induzieren<sup>31</sup>. Aus diesem Grund wurde die CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T-Zellsubpopulation (Tregs) untersucht. Neben der verstärkten Th1- und Th17-Differenzierung in den CK2-deletierten

Tieren, wurde ebenfalls eine größere Population an CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen gemessen. Diese erhöhte FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulation war sowohl in der Peripherie, als auch im GALT vertreten. Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um natürlich vorkommende regulatorischer T-Zellen (nTregs) handelt, wurde zusätzlich die CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation des Thymus untersucht. Die CK2-defizienten Tiere zeigten eine mehr als doppelt so große CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T-Zellpopulation im Thymus (8% statt 3%) verglichen mit WT Tieren. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich bei den FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Peripherie und im GALT um Tregs handelt, welche verstärkt im Thymus differenziert wurden und vom Thymus ausgehend die Peripherie und den GALT besiedeln. Für die Entwicklung im Thymus und ihr Überleben in der Peripherie, benötigen Tregs kostimulatorische Signale, wie CD80/CD86 welche durch CD28 der T-Zellen verarbeitet werden<sup>72,73</sup>. Darüber hinaus ist bekannt, dass eine bestimmte DC-Subpopulation innerhalb des Thymus spezialisiert ist, die Differenzierung von nTregs zu induzieren<sup>51</sup>. Diese DC-Population wird an Hand einer bestimmten Kombination ihrer Oberflächenmarker charakterisiert und ist als CD45RA<sup>-</sup>, CD8α<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup> und SIRPα<sup>+</sup> beschrieben. Merkmale dieser Population sind z.B. eine stärkere Expression ihrer kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, sowie die vergleichsweise starke Induktion von FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese DC-Subpopulation in den KO Tieren einen größeren Anteil innerhalb der CD11c<sup>+</sup> Zellen des Thymus ausmacht. Darüber hinaus zeigte diese vergrößerte DC-Population auch eine stark erhöhte Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80. Diese Ergebnisse lassen zusammengenommen die Schlussfolgerung zu, dass die erhöhte Zahl dieser DC-Subpopulation im Thymus mit ihrer verstärkten Expression von CD80 zu einer stärkeren Differenzierung von nTregs im Thymus führt.

Um den Effekt der gestörten Homöostase der DCs im GALT, auf Grund der CK2-Defizienz, *in vivo* zu überprüfen, wurde ein Model der oralen Toleranz gewählt. Die orale Toleranz ist als spezifische Unterdrückung einer humoralen und zellulären Immunantwort gegen ein zuvor oral verabreichtes harmloses Antigen definiert. Es ist bekannt, dass die orale Toleranz in mesenterialen Lymphknoten unter dem Einfluss von DCs aufrechterhalten wird. Hierbei nehmen spezialisierte DCs im Darm das Antigen auf, wandern zu den mesenterialen Lymphknoten und präsentieren hier das Antigen naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen<sup>74</sup>, wobei bevorzugt Tregs differenziert werden anstelle von T-Effektorzellen. Diese induzierten Tregs (iTregs) können dann die antigenspezifische Toleranz im GALT aufrechterhalten<sup>75,76</sup> (siehe Abb. 4.1).





**Abb. 4.1: WT DC Interaktion mit naiven  $CD4^+$  T-Zellen im GALT unter „steady-state“ Bedingungen**

Um zu überprüfen, ob eine antigenspezifische Toleranz erfolgreich induziert wurde, erfolgte nach der oralen Applikation (Toleranzinduktion) eine Immunisierung solcher Tiere mit dem Antigen in Kombination eines Adjuvans. Weitere 2 Wochen später wurde in den Tieren eine DTH (delayed type hypersensitivity) ausgelöst. Diese DTH beruht auf der Aktivierung von T-Zellen und sollte durch die zuvor erfolgte Toleranzinduktion verhindert werden. In der Tat konnte in WT Tieren erfolgreich eine Toleranz gegenüber Ovalbumin induziert werden. Dies zeigte die deutlich geringere Fußschwellung in den Ovalbumin gefütterten Tieren, welche als Maß der DTH diente. Zusätzlich konnte in den drainierenden Lymphknoten der tolerisierten Tiere eine erhöhte  $CD4^+$  FoxP3<sup>+</sup> T-Zellpopulation gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass die Toleranzinduktion in den WT Tieren zu einer Differenzierung von iTregs führte und dass diese iTregs, nachfolgende antigenspezifische Immunantworten inhibieren konnten. Hierfür spricht auch die beobachtete geringere Zytokinproduktion (IL-17, IFN- $\gamma$ ) der  $CD4^+$  T-Effektorzellen. Die Aufrechterhaltung der Toleranz im GALT von WT Tieren, in Abwesenheit von Gefahrensignalen, ist in Abbildung 4.1 A dargestellt. In den CK2-defizienten Tieren hingegen konnte keine Toleranz gegenüber Ovalbumin induziert werden. Auch die Zytokinproduktion in den drainierenden Lymphknoten (IL-17, IFN- $\gamma$ ) war in den „tolerisierten“ CK2-defizienten Tieren vergleichsweise stark erhöht. Interessanterweise

konnte in den drainierenden Lymphknoten der „tolerisierten“ CK2-defizienten Tiere eine gleich große CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T-Zellpopulation, wie in den WT Tieren beobachtet werden. Während in den tolerisierten WT Tieren diese erhöhte Treg-Population ausreichte, um Immunreaktionen gegen das oral applizierte Antigen zu unterdrücken, konnte eine gleich große Treg-Population in den CK2-defizienten Tieren keine Toleranz gegenüber dem oral applizierten Antigen aufrechterhalten. Wie bereits beschrieben ist die Differenzierung von iTregs ein entscheidender Faktor für die Aufrechterhaltung der Toleranz im GALT. Dies konnte eindrucksvoll gezeigt werden, indem der FoxP3 Enhancer CNS1 deletiert wurde<sup>77</sup>. In CNS1-deletierten Tieren fand eine normale Entwicklung der Tregs im Thymus statt, jedoch konnte aus CNS1-deletierten, naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen keine iTregs differenziert werden. In diesen CNS1-deletierten Tieren konnte gezeigt werden, dass sich im GALT und in der Lunge spontan Entzündungsreaktionen ausbildeten und zeigt somit, dass iTregs für die Aufrechterhaltung der Toleranz und die Inhibition von mukosalen Immunreaktionen von großer Bedeutung sind. In diesem Zusammenhang kann die erhöhte Treg-Population in den tolerisierten WT Tieren durch die Differenzierung von iTregs erklärt werden. Diese antigenspezifischen iTregs sind anschließend in der Lage die Toleranz gegenüber Ovalbumin aufrechtzuerhalten. In den „tolerisierten“ CK2-defizienten Tieren hingegen könnten diese antigenspezifischen iTregs fehlen. Die gleich große Treg Population in den „tolerisierten“ CK2-defizienten Tieren kann jedoch durch die verstärkte Treg-Differenzierung im Thymus erklärt werden. Die aus dem Thymus stammenden Tregs sind allerdings nicht in der Lage eine Toleranz gegenüber Ovalbumin aufrechtzuerhalten, da sie im Thymus nicht an Ovalbumin selektioniert wurden. Zusätzlich ist es denkbar, dass die Treg-Population in den CK2-defizienten Tieren in einer solch hohen Frequenz vorhanden ist und somit die Treg-Nischen dicht besiedelt sind, und keine weitere Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in iTregs möglich ist. Des Weiteren zeigen CK2-defiziente DCs eine niedrigere Expression der Aldh1a1 im GALT. Hierdurch wird eine im Vergleich zu WT DCs geringere Bildung von Retinsäure katalysiert und hat zur Folge, dass die Differenzierung von iTregs in CK2-defizienten Tieren gestört ist. Dies bedeutet, dass in den „tolerisierten“ CK2-defizienten Tieren die erhöhte Treg-Population aus dem Thymus zu stammen scheint und nicht aufgrund der Differenzierung von antigenspezifischen iTregs im GALT. Somit kann erklärt werden, warum die Treg-Population in den tolerisierten WT Tieren zu einer Aufrechterhaltung der Toleranz führt, während eine gleich große Treg-Population in „tolerisierten“ CK2-defizienten Tieren keine Toleranz aufrechterhalten kann. Neben der möglicherweise verminderten Induktion von iTregs könnte der vergleichsweise stark aktivierte Phänotyp der CK2-

defizienten „migratory“ DCs, auch in Gegenwart einer großen Zahl an Tregs, bevorzugt die Differenzierung von T-Effektorzellen und keine Toleranz gegenüber dem Antigen einleiten (siehe Abb.4.2). Hierfür spricht insbesondere die verstärkte Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 der CK2-defizienten DCs im GALT. Wie bereits beschrieben, ist dies ein wichtiges Aktivierungssignal für  $CD4^+$  T-Zellen durch Interaktion mit CD28. In Gegenwart von CD28 aktivierenden Signalen kann eine Suppression von  $CD4^+$  T-Zellen durch Tregs nicht mehr erfolgen<sup>78</sup>, so dass dies eine zusätzliche Erklärung für die bevorzugte Induktion einer Immunantwort, anstelle der Aufrechterhaltung der Toleranz in CK2-defizienten Tieren ist. Tatsächlich wurde in den „tolerisierten“ CK2-defizienten Tieren eine erhöhte Produktion von IL-17 und IFN- $\gamma$  durch  $CD4^+$  T-Zellen aus drainierenden Lymphknoten beobachtet. Diese erhöhte Zytokinproduktion geht auch mit einer erhöhten Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet und ROR $\gamma$ t einher. Insbesondere, die als pathogen geltende T-bet/ROR $\gamma$ t doppelt-positive T-Zellpopulation war in den „tolerisierten“ CK2-defizienten Tieren deutlich erhöht und lag mit 30% auf dem gleichen Niveau, wie in nicht tolerisierten WT Tieren. Das  $CD11b^+$  DCs in Lymphknoten des GALT die Differenzierung von IL-17- und IFN- $\gamma$ -produzierenden T-Effektorzellen einleiten können, ist bekannt<sup>79</sup> und führt anscheinend im Falle der CK2-Defizienz zu einer Differenzierung von T-Effektorzellen, welche sich nicht durch orale Toleranzmechanismen unterdrücken lässt.

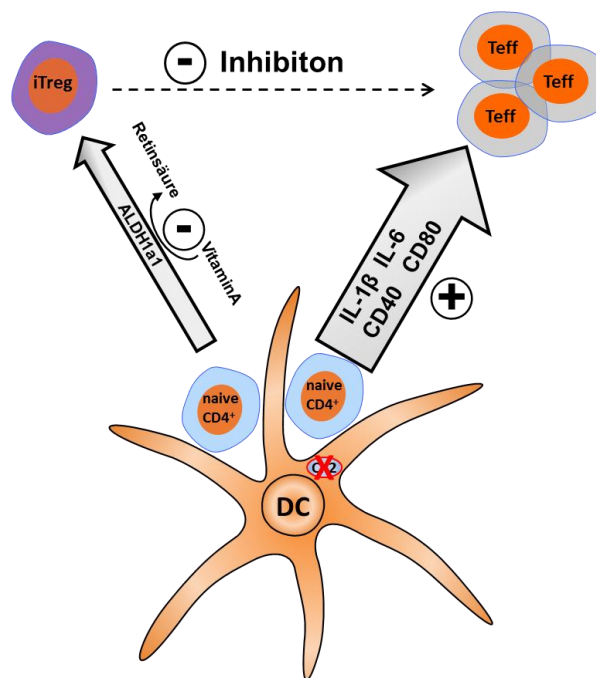


Abb. 4.2: CK2-defiziente DC Interaktion mit naiven  $CD4^+$  T-Zellen im GALT unter „steady-state“ Bedingungen

In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die CK2 einen entscheidenden Einfluss auf die Homöostase von DCs aus dem GALT besitzt. Dies äußert sich in einem stärker aktivierten Phänotyp der DCs und einer nachfolgend verstärkten CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung. Diese erhöhte CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung spiegelt sich in einer erhöhten Anzahl an sowohl Th1-Zellen, als auch Th-17 Zellen wider. Aus diesem Grund ist ein therapeutisches Nutzen der CK2 in DCs vorstellbar, indem die Signalwege positiv, oder negativ beeinflusst werden. So wäre eine Verstärkung der CK2-Signalwege, einhergehend mit Toleranz induzierenden DCs, möglicherweise bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen von therapeutischem Nutzen. Durch Inhibition der CK2 und der damit einhergehenden verstärkten T-Zellaktivierung, könnte ein therapeutischer Einsatz im Falle von Tumoren denkbar sein. Da Tumore aus stark proliferierenden körpereigenen Zellen entstehen, muss zur Bekämpfung der Tumore die Toleranz durchbrochen werden, was durch Inhibition der CK2 in DCs erreicht werden könnte.

---

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CK2-Defizienz in DCs aus dem GALT eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Toleranz spielt. Hier sind es vor allem die CD11b<sup>+</sup> DCs, die durch die CK2-Defizienz einen stärker aktivierten Phänotyp besitzen. Dieser umfasst eine erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD80 sowie eine verstärkte Expression pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 $\beta$  und IL-6. Das Enzym Aldh1a1, welches im GALT die Bildung von Retinsäure katalysiert und somit entscheidend an der Aufrechterhaltung der Toleranz beteiligt ist, wird hingegen in CK2-defizienten DCs geringer transkribiert. Der stärker aktivierte Phänotyp der CK2-defizienten DCs spiegelt sich auch auf der CD4<sup>+</sup> T-Zellebene wider. CK2-defiziente DCs induzieren eine deutlich stärkere CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation und zusätzlich konnte in CK2-defizienten Tieren eine geringere naive CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation gefunden werden. Einhergehend mit einer stärkeren CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung konnte eine erhöhte Th1- und Th17-Differenzierung beobachtet werden. Somit führt die CK2-Defizienz in DCs aus dem GALT bereits im „steady state“ zu einer bevorzugten Aktivierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen, anstelle einer Differenzierung von iTregs. Dies hat zur Folge, dass in CK2-defizienten Tieren keine Toleranz aufrechterhalten werden kann, wie am Beispiel der oralen Toleranz gezeigt wurde. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine DC-Population aus dem Thymus ebenfalls durch die CK2-Defizienz betroffen ist. Die Population der SIRP $\alpha$ <sup>+</sup> DCs im Thymus der CK2-Defizienten Tiere ist deutlich erhöht und zeigt zusätzlich eine gesteigerte Expression von CD80. Diese DC-Subpopulation induziert verhältnismäßig stark die Differenzierung von Tregs. Diese erhöhte DC-Subpopulation im Thymus steht daher auch im Einklang mit den beobachteten erhöhten Treg-Populationen in den CK2-defizienten Tieren.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Aldh1a1	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1
APC	Adenomatous-polypsois-coli-Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BALT	Bronchus associated lymphoid tissue
BMDCs	Bone marrow derived Dendritic Cells
CD	Cluster of Differentiation
cDCs	Conventional Dendritic Cells
cDNA	complementary DNA
CFA	Complete Freund´s Adjuvant
CFSE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CK2	Casein-Kinase 2
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CpG	Deoxycytidylate-phosphate-deoxyguanylate
DCs	Dendritic Cells
DMAT	2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole
DNA	Desoxyribonucleicacid
DTH	Delayed Type Hypersensitivity
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FOXP3	Forkhead Box P3
GALT	Gut associated lymphoid tissue
GATA-3	GATA binding protein 3
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor
GSK-3 $\beta$	Glykogensynthase-Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
i.f.	intra-footpad
IBD	Inflammatory bowel diseases
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFA	Incomplete Freund´s Adjuvant
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$

---

IL	Interleukin
Iono	Ionomycin
KO	Knock-out
LFA	Lymphocyte function-associated antigen
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MEM	Minimal Essential Medium
MHC	Major Histocompatibility Complex
mLN	Mesenterialer Lymphknoten
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa B
nTreg	Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen
OVA	Ovalbumin
p.o.	Peroral
PAMPs	Pattern associated molecular patterns
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pDCs	Plasmacytoid Dendritic Cells
pLN	Peripherer Lymphknoten
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	Pattern Recognition Receptors
RA	Retinoic acid (Retinsäure)
RIG I	retinoic acid inducible gene I
RNA	Ribonucleicacid
ROR $\gamma$ t	Retinoid orphan receptor gamma t
s.c.	subcutaneous
SIRP $\alpha$	Signal-regulatory protein alpha
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
T-bet	T-box expressed in T cells
TCF/LEF	T-cell factor/ lymphoid enhancer factor
Teff	T-Effektorzellen
TGF- $\beta$	Tumor Growth Factor- $\beta$
Th(-1,-2,-9,-17)	T-Helferzelle-(1,2,9,17)
TM5	Testmedium + 5% FCS
Wnt	Wingless
WT	Wildtyp

## 7. Literaturverzeichnis

1. *Immunbiologie*. (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008).doi:10.1007/978-3-540-72569-5
2. West, A. P., Koblansky, A. A. & Ghosh, S. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annual review of cell and developmental biology* **22**, 409–37 (2006).
3. Janeway, C. A. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology today* **13**, 11–6 (1992).
4. Burnet, M. F. The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity. *Cambridge: Cambridge University Press*
5. Kappler, J. W., Staerz, U., White, J. & Marrack, P. C. Self-tolerance eliminates T cells specific for MIs-modified products of the major histocompatibility complex. *Nature* **332**, 35–40 (1988).
6. Langerhans, P. Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin* **44**, 325–337 (1868).
7. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* **137**, 1142–62 (1973).
8. Steinman, R. M. & Witmer, M. D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 5132–6 (1978).
9. Engering, A. J. *et al.* The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *European journal of immunology* **27**, 2417–25 (1997).
10. Jiang, W. *et al.* The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **375**, 151–5 (1995).
11. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of experimental medicine* **182**, 389–400 (1995).
12. Reis e Sousa, C., Stahl, P. D. & Austyn, J. M. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *The Journal of experimental medicine* **178**, 509–19 (1993).
13. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* **20**, 197–216 (2002).
14. Honey, K. & Rudensky, A. Y. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nature reviews. Immunology* **3**, 472–82 (2003).



15. Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. & Lanzavecchia, A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388**, 782–7 (1997).
16. Reiser, H. *et al.* Murine B7 antigen provides an efficient costimulatory signal for activation of murine T lymphocytes via the T-cell receptor/CD3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 271–5 (1992).
17. Bierer, B. E. & Burakoff, S. J. T cell adhesion molecules. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2**, 2584–90 (1988).
18. Maldonado-López, R. & Moser, M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Seminars in immunology* **13**, 275–82 (2001).
19. Maldonado-López, R. *et al.* CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* **189**, 587–92 (1999).
20. Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L. & Paul, W. E. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell research* **16**, 3–10 (2006).
21. Zheng, W. & Flavell, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**, 587–96 (1997).
22. Asselin-Paturel, C. *et al.* Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nature immunology* **2**, 1144–50 (2001).
23. Atarashi, K. *et al.* ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* **455**, 808–12 (2008).
24. Fortin, G. *et al.* A role for CD47 in the development of experimental colitis mediated by SIRPalpha+CD103- dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **206**, 1995–2011 (2009).
25. Ivanov, I. I. *et al.* The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121–33 (2006).
26. Schmitt, E. *et al.* IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **153**, 3989–96 (1994).
27. Staudt, V. *et al.* Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity* **33**, 192–202 (2010).
28. Chang, H.-C. *et al.* The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nature immunology* **11**, 527–34 (2010).

29. Fallarino, F. *et al.* Ligand and cytokine dependence of the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in plasmacytoid dendritic cells. *International immunology* **17**, 1429–38 (2005).
30. Yamazaki, S. *et al.* CD8<sup>+</sup> CD205<sup>+</sup> splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **181**, 6923–33 (2008).
31. Coombes, J. L. *et al.* A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1757–64 (2007).
32. Ehrchiou, D. *et al.* CD11b facilitates the development of peripheral tolerance by suppressing Th17 differentiation. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1519–24 (2007).
33. Kriegel, M. A., Rathinam, C. & Flavell, R. A. Pancreatic islet expression of chemokine CCL2 suppresses autoimmune diabetes via tolerogenic CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 3457–62 (2012).
34. Sun, C.-M. *et al.* Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1775–85 (2007).
35. Kappler, J. W., Staerz, U., White, J. & Marrack, P. C. Self-tolerance eliminates T cells specific for Mls-modified products of the major histocompatibility complex. *Nature* **332**, 35–40 (1988).
36. Thornton, A. M. & Shevach, E. M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. *Journal of Experimental Medicine* **188**, 287–296 (1998).
37. Bopp, T. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1303–10 (2007).
38. Cederbom, L., Hall, H. & Ivars, F. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *European journal of immunology* **30**, 1538–43 (2000).
39. Schwartz, R. H. T cell anergy. *Annual review of immunology* **21**, 305–34 (2003).
40. Litchfield, D. W. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *The Biochemical journal* **369**, 1–15 (2003).
41. Meggio, F. & Pinna, L. A. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 349–68 (2003).

42. Zhou, J., Cheng, P., Youn, J.-I., Cotter, M. J. & Gabrilovich, D. I. Notch and wingless signaling cooperate in regulation of dendritic cell differentiation. *Immunity* **30**, 845–59 (2009).
43. Pinna, L. A. Protein kinase CK2: a challenge to canons. *Journal of Cell Science* **115**, 3873–3878 (2002).
44. Manicassamy, S. *et al.* Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine. *Science (New York, N.Y.)* **329**, 849–53 (2010).
45. Caton, M. L., Smith-Raska, M. R. & Reizis, B. Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8- dendritic cells in the spleen. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1653–64 (2007).
46. Buchou, T. *et al.* Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality. *Molecular and cellular biology* **23**, 908–15 (2003).
47. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **155**, 1151–64 (1995).
48. Kummerow, C. *et al.* The immunological synapse controls local and global calcium signals in T lymphocytes. *Immunological reviews* **231**, 132–47 (2009).
49. Klausner, R. D., Donaldson, J. G. & Lippincott-Schwartz, J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *The Journal of cell biology* **116**, 1071–80 (1992).
50. Probst, H. C. *et al.* Histological analysis of CD11c-DTR/GFP mice after in vivo depletion of dendritic cells. *Clinical and experimental immunology* **141**, 398–404 (2005).
51. Proietto, A. I. *et al.* Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 19869–74 (2008).
52. Romani, N. *et al.* Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *The Journal of experimental medicine* **169**, 1169–78 (1989).
53. Larsen, C. P., Ritchie, S. C., Pearson, T. C., Linsley, P. S. & Lowry, R. P. Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. *The Journal of experimental medicine* **176**, 1215–20 (1992).
54. Jung, M. Y., Kim, H.-S., Hong, H.-J., Youn, B.-S. & Kim, T. S. Adiponectin induces dendritic cell activation via PLC $\gamma$ /JNK/NF- $\kappa$ B pathways, leading to Th1 and Th17 polarization. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **188**, 2592–601 (2012).

55. Palová-Jelínková, L. *et al.* Gliadin fragments induce phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **175**, 7038–45 (2005).
56. Lin, Y.-L., Liang, Y.-C., Lee, S.-S. & Chiang, B.-L. Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of leukocyte biology* **78**, 533–43 (2005).
57. Sun, Z., Ren, H., Liu, Y., Teeling, J. L. & Gu, J. Phosphorylation of RIG-I by casein kinase II inhibits its antiviral response. *Journal of virology* **85**, 1036–47 (2011).
58. Saito, T. *et al.* Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 582–7 (2007).
59. Liu, K. & Nussenzweig, M. C. Origin and development of dendritic cells. *Immunological reviews* **234**, 45–54 (2010).
60. Bradley, L. M., Watson, S. R. & Swain, S. L. Entry of naive CD4 T cells into peripheral lymph nodes requires L-selectin. *The Journal of experimental medicine* **180**, 2401–6 (1994).
61. Arbonés, M. L. *et al.* Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* **1**, 247–60 (1994).
62. Gallatin, W. M., Weissman, I. L. & Butcher, E. C. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* **304**, 30–4
63. Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235–8 (2006).
64. Mangan, P. R. *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**, 231–4 (2006).
65. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179–89 (2006).
66. Boniface, K., Blom, B., Liu, Y.-J. & de Waal Malefyt, R. From interleukin-23 to T-helper 17 cells: human T-helper cell differentiation revisited. *Immunological reviews* **226**, 132–46 (2008).
67. Jung, M. Y., Kim, H.-S., Hong, H.-J., Youn, B.-S. & Kim, T. S. Adiponectin induces dendritic cell activation via PLCγ/JNK/NF-κB pathways, leading to Th1 and Th17 polarization. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **188**, 2592–601 (2012).
68. De Becker, G. *et al.* Regulation of T helper cell differentiation in vivo by soluble and membrane proteins provided by antigen-presenting cells. *European journal of immunology* **28**, 3161–71 (1998).

- 
69. Jacobson, N. G. *et al.* Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *The Journal of experimental medicine* **181**, 1755–62 (1995).
  70. Xu, X., Sun, Y. L. & Hoey, T. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science (New York, N.Y.)* **273**, 794–7 (1996).
  71. Iwata, M., Eshima, Y. & Kagechika, H. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *International immunology* **15**, 1017–25 (2003).
  72. Salomon, B. *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* **12**, 431–40 (2000).
  73. Inaba, K. *et al.* The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *The Journal of experimental medicine* **180**, 1849–60 (1994).
  74. Worbs, T. *et al.* Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **203**, 519–27 (2006).
  75. Thorstenson, K. M. & Khoruts, A. Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **167**, 188–95 (2001).
  76. Zhang, X., Izikson, L., Liu, L. & Weiner, H. L. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **167**, 4245–53 (2001).
  77. Josefowicz, S. Z. *et al.* Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* **482**, 395–9 (2012).
  78. Thornton, A. M. & Shevach, E. M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of experimental medicine* **188**, 287–96 (1998).
  79. Cerovic, V. *et al.* Intestinal CD103(-) dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells. *Mucosal immunology* (2012).doi:10.1038/mi.2012.53

**Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurden die persönlichen Daten hier entfernt**

**Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurden die persönlichen Daten hier entfernt**

## **Danksagung**

Mein Dank gilt an erster Stelle meinen Betreuern (Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurden die Namen entfernt). Zum einen für die Möglichkeit unter ihrer Anleitung dieses interessante Thema zu bearbeiten und zum anderen für die exzellente Betreuung während dieser Arbeit. Mit einer stets offenen Tür bestand zu jeder Zeit die Möglichkeit zur Diskussion aktueller Versuche. Auch die Art und Weise mit der sie uns Doktoranden begegneten ist beispielhaft!

Vielen Dank!

Weiterer Dank gilt (Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurde der Name entfernt) für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei (Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurde der Name entfernt), für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten, bedanken.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei „meinem“ Büro 1.035...schön war's!

Nicht vergessen möchte ich (Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurden die Namen entfernt). Durch deren Betreuung während meines Praktikums ich erst zur Immunologie kam!

Vielen Dank!