

# Transkriptions- und Expressionsmuster von Genen der TGF- $\beta$ Superfamilie in *murinen* Dendritischen Zellen

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von  
**Hannes Tilman Hägele**  
aus Aalen (Baden-Württemberg)  
Gießen 2016

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin  
Leiter: Prof. Dr. Gregor Bein  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. H. Hackstein
  2. Gutachter: Herr PD Dr. rer. nat. L. Konrad
- Tag der Disputation: 04.10.2016

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Dendritische Zellen .....	1
1.1.1	Entstehung Dendritischer Zellen .....	1
1.1.2	Konventionelle Dendritische Zellen (cDC) und Langerhanszellen .....	3
1.1.3	Plasmazytoide Dendritische Zellen (pDC).....	4
1.1.3.1	Sekretion von IFN- $\alpha$ .....	5
1.1.3.2	Lebenszyklus und Differenzierung .....	6
1.1.3.3	Pathogenerkennung .....	7
1.1.3.4	Migration.....	8
1.1.3.5	Antigenpräsentation und Aktivierung von B- und T-Zellen .....	9
1.2	Die TGF- $\beta$ Superfamilie.....	10
1.2.1	TGF- $\beta$ .....	11
1.2.1.1	Der TGF- $\beta$ Signalweg .....	11
1.2.1.2	Die Regulation Dendritischer Zellen durch TGF- $\beta$ .....	13
1.2.1.3	Dendritische Zellen synthetisieren TGF- $\beta$ .....	14
1.2.2	Der <i>left-right determination factor</i> .....	14
1.3	Wundheilung .....	16
1.3.1	Die Phasen der regulären Wundheilung.....	16
1.3.2	TGF- $\beta$ in der Wundheilung.....	17
1.4	Zielsetzung und Vorgehensweise.....	19
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>21</b>
2.1	Material .....	21
2.1.1	Geräte und Zubehör.....	21
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	22
2.1.3	Versuchstiere .....	23
2.1.4	Fluorochrome mit Extinktionswerten.....	24
2.1.5	Antikörper .....	24
2.1.6	<i>Beads</i> .....	25
2.1.7	Chemikalien .....	25

2.1.8	Zytokin- und Proteinfärbung / ELISAs .....	26
2.1.9	<i>Assays</i> und <i>Primer</i> .....	27
2.1.10	Rekombinante Proteine .....	27
2.1.11	Puffer und Medien.....	27
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Versuchstiere .....	29
2.2.2	Zellisolation.....	29
2.2.2.1	Isolation <i>muriner</i> Knochenmarkszellen .....	29
2.2.2.2	Herstellung einer Zellsuspension aus <i>murinen</i> Milzen .....	29
2.2.2.3	Herstellung einer Zellsuspension aus <i>murinen</i> Lungen mit <i>Klebsiella</i> Pneumonie.....	30
2.2.3	Die Zellkultur .....	30
2.2.4	Zellzahlbestimmung in der Neubauer Zählkammer.....	31
2.2.5	Durchflusszytometrische Methoden.....	31
2.2.5.1	<i>Magnetic activated cell sorting</i> (MACS).....	31
2.2.5.2	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (FACS).....	31
2.2.6	Herstellung eines <i>Klebsiella pneumoniae</i> Lysates.....	35
2.2.7	Zellstimulation .....	36
2.2.8	<i>Fluorescent Bead Assay</i> zur Quantifizierung der IFN- $\alpha$ Sekretion .....	36
2.2.9	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) .....	37
2.2.9.1	Quantifizierung des Proteins Lefty .....	37
2.2.10	RT <sup>2</sup> PCR.....	38
2.2.10.1	RNA-Isolation .....	38
2.2.10.2	RNA Konzentrationsbestimmung .....	38
2.2.10.3	cDNA Synthese .....	39
2.2.10.4	cDNA Präamplifikation.....	39
2.2.10.5	<i>Real-Time</i> Polymerasekettenreaktion ( <i>Real-Time-PCR</i> ) .....	39
2.2.11	Statistik.....	40
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
3.1	Zellexpansion und -analyse .....	41
3.1.1	Wachstumskinetik von DC <i>in vitro</i> .....	41
3.1.2	Durchflusszytometrische Analyse des Phänotyps <i>in vitro</i> generierter DC .....	42

3.1.3	Validierung des Phänotyps <i>in vitro</i> generierter pDC anhand der Sekretion von IFN- $\alpha$ .....	43
3.2	Ergebnisse des RT <sup>2</sup> -PCR <i>Mikroarray</i> .....	44
3.2.1	Lefty-Expression auf Transkriptionsebene .....	44
3.2.1.1	Nachweis der Lefty-Expression <i>in vitro</i> generierter pDC.....	44
3.2.1.2	Nachweis der Lefty-Expression in pDC der Milz <i>ex vivo</i> .....	45
3.2.1.3	Nachweis der Lefty-Expression im <i>Klebsiella</i> Pneumonie Modell ....	46
3.2.1.4	Die Lefty-Expression ist pDC spezifisch.....	47
3.2.2	Nachweis des Lefty-Proteins in pDC Zelllysate .....	49
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>50</b>
4.1	Erfolgreiche Expansion von pDC <i>in vitro</i> .....	50
4.2	Exakte Phänotypisierung dendritischer Subpopulationen.....	51
4.3	Expression von Lefty durch pDC.....	53
4.4	Die Lefty-Expression ist relativ pDC spezifisch.....	54
4.5	Lefty antagonisiert den TGF- $\beta$ Signalweg.....	55
4.5.1	Mögliche intrazelluläre Bedeutung .....	56
4.5.2	Mögliche parakrine Bedeutung .....	57
4.6	Limitation der Studie.....	59
4.7	Ausblick .....	60
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>66</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>67</b>
<b>11</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>73</b>
<b>12</b>	<b>ERKLÄRUNG.....</b>	<b>79</b>
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>80</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Dendritische Zellen

Als Dendritische Zellen (DC) wird eine seltene und heterogene Zellfamilie (<1% der mononukleären Zellen des peripheren Blutes) bezeichnet. Steinman und Cohn beschrieben sie 1973 zum ersten Mal in Milzzellen von Mäusen und benannten sie aufgrund ihrer zahlreichen astartigen Ausläufern nach dem griechischen Wort „*dendros*“ (Baum) [1].

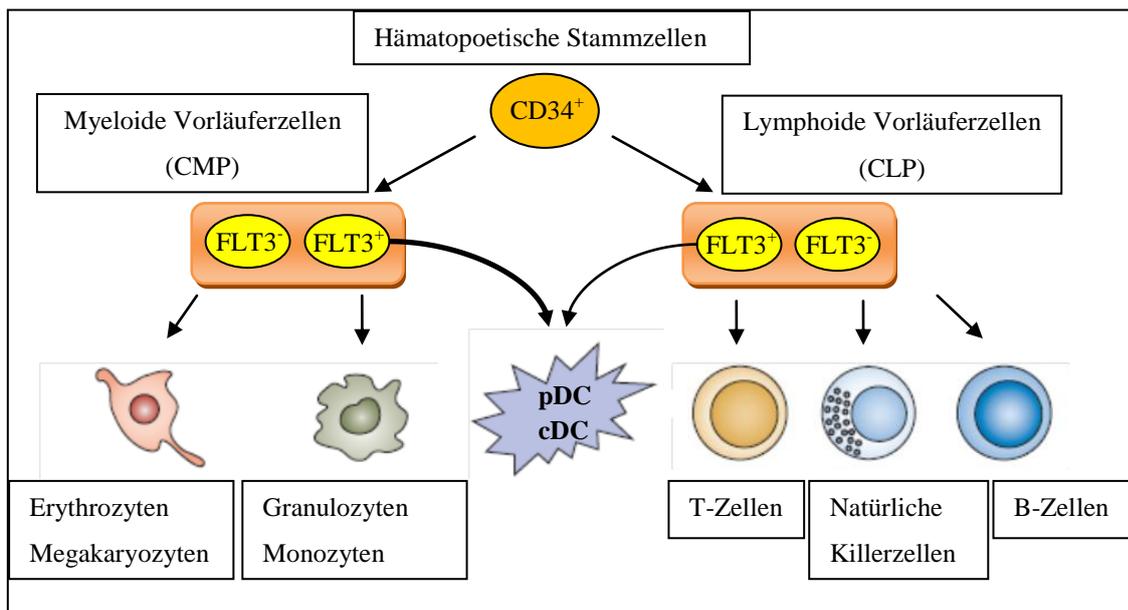
DC werden in zwei Gruppen eingeteilt: die konventionellen Dendritischen Zellen (cDC) und die plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDC). Die Hauptaufgabe von cDC besteht in der Antigenpräsentation und der Aktivierung naiver T-Zellen. pDC sezernieren nach Aktivierung große Mengen an IFN- $\alpha$  und beeinflussen auf diesem Weg sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunreaktion [2].

Der Anteil der unterschiedlichen Subpopulationen Dendritischer Zellen bei Mäusen variiert zwischen verschiedenen Inzuchtstämmen [3].

### 1.1.1 Entstehung Dendritischer Zellen

DC stammen, wie alle Blutzellen, von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Durch Differenzierung entstehen aus den Stammzellen myeloide „*common myeloid progenitor*“ (CMP) und lymphatische „*common lymphoid progenitor*“ (CLP) Vorläuferzellen. Alle DC-Subpopulationen (pDC, CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> cDC, CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> cDC, LC) können sowohl aus CLP als auch aus CMP hervorgehen [4]. CMP sind effizienter bei der Generation von cDC der Milz und der Lymphknoten. CLP entwickeln sich vermehrt zu cDC des Thymus und zu pDC. Die Fähigkeit zur DC-Differenzierung bleibt auch nach der weiteren Differenzierung von CLP zu frühen T-Vorläuferzellen erhalten. Im Gegensatz dazu verlieren aus CLP hervorgegangene B-Vorläuferzellen die Fähigkeit zur DC-Differenzierung. Auch aus CMP entstandene „*granulocyte-macrophage progenitor*“ (GMP) und Monozyten können weiter zu DC differenzieren [5–7].

DC entstehen aus Vorläuferzellen, die den FLT3-Rezeptor exprimieren. Dies trifft sowohl für Vorläuferzellen der lymphoiden als auch für Vorläuferzellen der myeloiden Zellreihe zu. Der FLT3-Rezeptor wird durch den FLT3-Liganden aktiviert, der einen Wachstumsfaktor hämatopoetischer Stammzellen darstellt [8]. Zusätzlich wird die Differenzierung der Vorläuferzellen zu DC durch Zytokine wie beispielsweise den GM-CSF, TNF- $\alpha$  und IL-4 gefördert [9], während die Reifung der DC durch mikrobielle Stimuli ausgelöst wird [10].



**Abbildung 1: Entwicklung Dendritischer Zellen**

Dendritische Zellen entwickeln sich aus CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen. Diese differenzieren zuerst zu CLP und CMP. CDC und pDC entstehen aus den FLT3<sup>+</sup> Vorläuferzellen beider Zellreihen. Aus welcher Zellreihe die DC letztendlich differenzieren hängt *in vivo* von der Verfügbarkeit der Vorläuferzellen, lokalen Einflüssen und dem Umgebungsgewebe ab. Unter normalen Umständen entstehen jedoch die meisten DC aus der myeloiden Vorläuferreihe. Modifiziert nach Shortman 2006 [11]. Übernahme mit Genehmigung von RightsLink®.

Die DC-Subpopulationen unterscheiden sich durch ihre spezifischen Entwicklungen und Funktionen. Da DC nach Stimulation jedoch auch ihren Phänotyp ändern können, muss zwischen funktioneller Plastizität und Heterogenität der Subpopulationen unterschieden werden [6, 12]. Zur Entwicklung der DC-Subpopulationen existieren zwei verschiedene Modelle. Im Modell der funktionellen Plastizität wird davon ausgegangen, dass die Subpopulationen verschiedenen Aktivierungsstadien einer einzelnen Zelllinie entsprechen [12]. Die Differenzierung ist hierbei von

Umweltsignalen abhängig [12]. Alternativ existiert das Modell der spezialisierten Zelllinien [12]. Dieses besagt, dass die DC-Subpopulationen von unterschiedlichen Vorläuferzellen abstammen. Demnach sind die Vorläuferzellen bereits verschieden und in ihrer späteren Funktion festgelegt [12]. Beiden Modellen gelingt es jedoch nicht die Differenzierung von DC ausreichend darzustellen. Daher wird eine Mischung beider Modelle angenommen, mit großer funktioneller Plastizität von pDC und cDC [12].

### 1.1.2 Konventionelle Dendritische Zellen (cDC) und Langerhanszellen

DC haben Ausläufer mit einer großen Oberfläche, welche optimal zur Aufnahme und Präsentation von Antigenen geeignet ist. Unreife DC werden durch die Aufnahme von Antigenen stimuliert und reifen. Unter Reifung wird bei DC die Expression von großen Mengen an MHC-, kostimulatorischen- und Adhäsionsmolekülen an ihrer Oberfläche verstanden. Dies ermöglicht die Präsentation von Antigenen und die Aktivierung von T-Zellen, B-Zellen und natürlichen Killerzellen. DC können darüber hinaus auch Toleranz gegen körpereigene Antigene bei T-Zellen induzieren [13].

Reife *murine* cDC exprimieren die Marker CD11c, CD80, CD86 und CD40. Sie zeigen eine mittlere bis hohe Expression von MHC Klasse II Molekülen. Nach Stimulation steigt die Expression dieser Moleküle weiter, sie korreliert mit der Fähigkeit der cDC zur allogenen T-Zell Stimulation [12].

DC können Infektionen auf direktem und indirektem Weg erkennen. Direkt können pDC mit Hilfe von *Pattern-recognition* Rezeptoren (PRR) wie dem Lektin Rezeptor, dem *Scavenger* Rezeptor und den *Toll-like* Rezeptoren verschiedenartige pathogene Strukturen erkennen. Indirekt registrieren cDC die Expression von Zytokinen durch infizierte Zellen [14].

Bei cDC wird zwischen ortsgebundenen cDC des lymphatischen Gewebes und migrierenden cDC des nicht-lymphatischen Gewebes unterschieden. Zu den cDC des nicht-lymphatischen Gewebes zählen die  $CD103^+CD11b^-$  cDC, die  $CD103^+CD11b^+$  intestinale cDC sowie die  $CD103^-CD11b^+$ cDC. Auch die Langerhanszellen werden in nicht-lymphatischem Gewebe vorgefunden. Die cDC des nicht-lymphatischen Gewebes nehmen Antigene auf, die sie nach Einwanderung in die T-Zell-Zone regionaler Lymphknoten präsentieren. Während der Wanderung zu den Lymphknoten erhöhen cDC die Expression von MHC Klasse II und kostimulatorischen Molekülen, was als

Reifung bezeichnet wird. In den Lymphknoten angekommen, nehmen sie keine Antigene mehr auf [6, 15, 12].

Langerhanszellen sind ein bekanntes Beispiel der cDC. Langerhanszellen sind phagozytotisch aktiv und enthalten große Granula, die sogenannte Birbeck-Granula [16]. Bei Infektionen in der Haut nehmen Langerhanszellen Antigene auf, wandern in regionale Lymphknoten ein und reifen. Dabei verlieren sie die Fähigkeit zur weiteren Antigenaufnahme, erhöhen aber die Expression von MHC-Molekülen. Bei der Ankunft in den Lymphknoten zeigen sie weitere kostimulatorische Moleküle wie beispielsweise CD40, CD80 und CD86 sowie eine Vielzahl an Adhäsionsmolekülen auf ihrer Oberfläche, um dort mit T-Zellen in Wechselwirkung treten zu können und das aufgenommene Antigen wirkungsvoll zu präsentieren [16, 17].

Ortsgebundene cDC des lymphatischen Gewebes sind in Funktion und Lebensdauer begrenzt auf ein Lymphorgan. Sie haben einen unreifen Phänotyp, nehmen aktiv Antigene im Lymphorgan auf und prozessieren diese [6]. In Lymphknoten werden gleichzeitig DC des nicht-lymphatischen und DC des lymphatischen Gewebes vorgefunden. In der Milz hingegen befinden sich überwiegend ortsgebundene cDC des lymphatischen Gewebes [6]. Diese bestehen vornehmlich aus den zwei Subpopulationen CD8<sup>+</sup> cDC und CD11b<sup>+</sup> cDC [15, 12, 6].

Aus den Milzen von mit *Lysteria monocytogenes* infizierten Mäusen konnte eine weitere DC Subpopulation isoliert werden. Diese wird Tip-DC („*TNF and inducible NO-synthase producing DC*“) genannt und produziert den Tumor Nekrose Faktor (TNF) und die induzierbare NO-Synthase [18].

### 1.1.3 Plasmazytoide Dendritische Zellen (pDC)

Lennert und Remmele entdeckten 1958 eine Zellart, die reichlich in der T-Zellzone des lymphatischen Gewebes vorzufinden ist und morphologisch Plasmazellen ähnelt [19]. Die Zellart fand zunächst wenig Beachtung bis in den 1980er Jahren durch Zelllinienspezifische Antikörper die Wiedererkennung in Gewebsschnitten vereinfacht wurde. Dies erst führte zu weiteren Untersuchungen von Phänotyp und Funktionalität [20]. Der Name pDC setzte sich erst im Laufe der Jahre durch, bekannt war die Zelle unter den Namen T-assoziierte Plasmazelle, plasmazytoide T-Zelle, plasmazytoider Monozyt und Interferon produzierende Zelle (IPC) [20].

1999 gelang Siegal et al. der Nachweis, dass es sich bei DC mit plasmazytoidem Phänotyp und IPC um dieselbe Zelllinie handelt [21].

Der Anteil von pDC bei Menschen, wie auch bei der Maus, beträgt circa 0,2-0,8% der mononukleären Blutzellen [22].

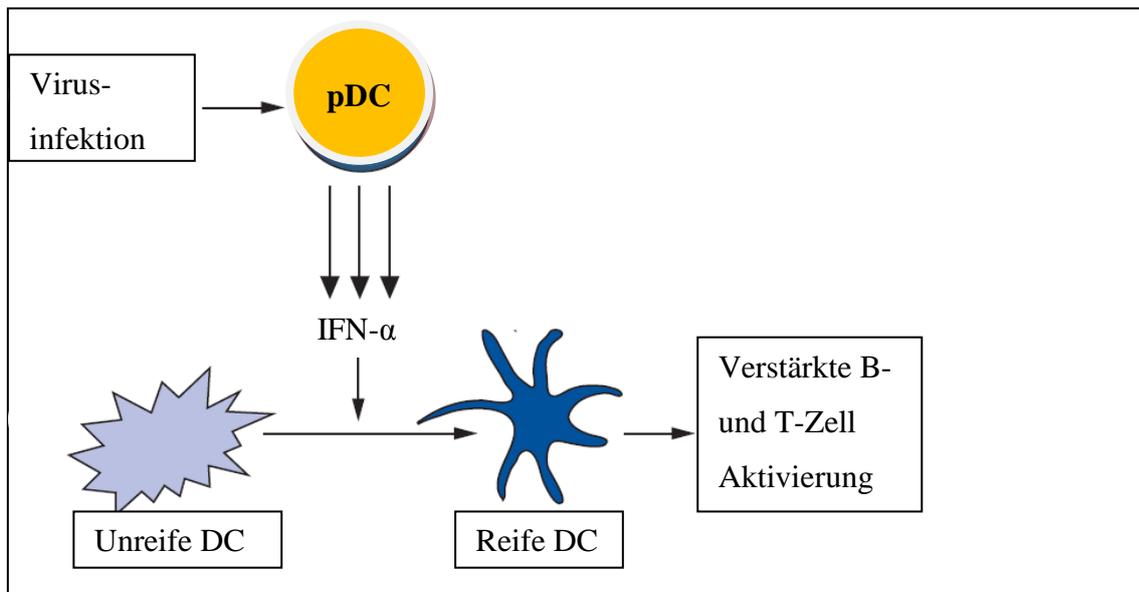
### **1.1.3.1 Sekretion von IFN- $\alpha$**

pDC besitzen die Fähigkeit zur Sekretion großer Mengen an IFN- $\alpha$  nach Stimulation, bis zu 1000-mal mehr als andere Zellarten. Deshalb werden pDC auch als Interferon produzierende Zellen (IPC) bezeichnet [14]. Als IFN- $\alpha$  Familie wird eine Gruppe stark verwandter Proteine bezeichnet, die ihre Wirkung über den IFN- $\alpha$  Rezeptor ausübt. Die Proteine werden nur in Teilen glykosyliert [23]. Die Proteine werden beim Menschen durch 14 verschiedene Gene kodiert, darunter ein Pseudogen und zwei identische Gene [23]. Die IFN-Familie besteht somit aus zwölf Mitgliedern mit jeweils weiteren allelischen Vielfalten. Bei diesen sind nur ein bis zwei Aminosäuren vertauscht [23]. Die einzelnen Mitglieder besitzen unterschiedliche biologische Aktivitäten [23]. Der Grund für diese Vielfalt von IFN- $\alpha$  ist bisher nicht bekannt. Therapeutisch genutzt werden bisher nur rekombinantes IFN- $\alpha$ a, IFN- $\alpha$ 2b und IFN- $\alpha$ 2c [23].

Nach viraler Stimulation wird bei pDC die Transkription von Genen der IFN- $\alpha$  Familie rasch hochreguliert [14].

IFN- $\alpha$  sind an der Entzündungsregulation beteiligt, sie wirken immunstimulierend, antiviral, antiproliferativ und stärken die zytotoxische Aktivität von natürlichen Killerzellen und T-Zellen. Interferone wirken sowohl als Warnsignal bei Infektionen als auch als Effektormolekül das die Verbreitung der Infektion verhindert [14, 23]. Durch die Sekretion von Interferonen können pDC das angeborene (z.B. natürliche Killerzellen) sowie das erworbene Immunsystem (z.B. T-Zellen) aktivieren [24].

Auf pDC wirkt IFN- $\alpha$  als autokriner Überlebensfaktor, fördert jedoch vermutlich nicht deren weitere Differenzierung zu reifen DC [14]. Im Gegensatz dazu, reifen durch IFN- $\alpha$  stimulierte cDC funktionell, sie zeigen außerdem eine höhere Expression von CD40, CD80, CD83, CD 86 sowie von MHC Klasse I und II Molekülen [14]. Die gereiften DC sind effizienter in der Stimulation von T-Zellen. pDC stellen damit eine Verbindung zwischen dem angeborene und dem erworbenen Immunsystem her [14].



**Abbildung 2: pDC verbinden das angeborene mit dem erworbenen Immunsystem**

Durch Virusinfektionen stimulierte pDC sezernieren große Mengen an IFN- $\alpha$ . Dieses regt unreife DC zur Reifung an. Gereifte DC können Antigene effektiver präsentieren. Modifiziert nach Le Bon et al. 2002 [14]. Übernahme mit Genehmigung von RightsLink®.

### 1.1.3.2 Lebenszyklus und Differenzierung

pDC differenzieren, wie alle DC, aus CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks [25]. *Murine* pDC haben eine Lebensspanne von circa zwei Wochen [26]. pDC entstehen im Gegensatz zu anderen DC Subpopulationen direkt im Knochenmark, zirkulieren in der Blutbahn und erreichen über die hochendothelialen Venolen die T-zellreichen Zonen entzündeter Lymphknoten [12, 27, 26]. Der FLT3-Ligand ist das hauptsächlich an der Differenzierung zu pDC beteiligte Zytokin [11]. Es wurde gezeigt, dass sich Knochenmarkszellen in Kultur mit dem FLT3-Liganden zu über 40% zu pDC differenzieren [28]. GM-CSF und TNF- $\alpha$  hingegen verhindern die Differenzierung von Vorläuferzellen zu pDC [28].

Die Bedingungen, die *in vivo* zu einer Differenzierung von pDC aus den unterschiedlichen Vorläuferzellen beitragen, sind noch nicht endgültig geklärt. Es wird angenommen, dass sich pDC aus spezialisierten Zelllinien mit großer funktioneller Plastizität entwickeln [12, 6, 15]. Aufgrund von unterschiedlicher Genexpression bei pDC in peripheren lymphatischen Organen wird davon ausgegangen, dass unterschiedliche Differenzierungswege existieren müssen [11, 29]. So zeigt eine Untergruppe von pDC die für B-Lymphozyten typische D-J Umordnung in den IgH-

Genen und die Expression weiterer B-lymphozyärer Gene, wohingegen eine andere Untergruppe von pDC nicht über diese Merkmale verfügt [11, 29]. Die beiden Untergruppen unterscheiden sich auch in ihrer Fähigkeit der T-Zell Stimulation und Zytokinproduktion [11, 29].

pDC können zu cDC ähnlichen DC (*pDC-derived DC*) weiter differenzieren [30, 22, 31]. Die *pDC-derived DC* haben eine typisch dendritische Morphologie, sie exprimieren konstitutiv große Mengen an MHC Klasse II Molekülen und können sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten stimulieren [31]. Jedoch bestehen zwischen *pDC-derived DC* und cDC wichtige Unterschiede bei der Aufnahme von Antigenen und deren T-Zell Präsentation [31].

Als Stimuli zur Differenzierung von pDC gelten unter anderem Viren, IL-3, CD40L und unmethylierte bakterielle DNA (CpG-ODN). Abhängig vom Stimulus differenzieren pDC zu funktionell unterschiedlichen *pDC-derived DC* [20, 30, 22, 31].

### 1.1.3.3 Pathogenerkennung

pDC weisen als Sensoren zur Pathogenerkennung die *Toll-like* Rezeptoren TLR7 und TLR9 auf [26, 32]. TLR2, TLR3, TLR4 und TLR5, die bakterielle Produkte wie Peptidoglykane, Lipopolysaccharide und Flagellin erkennen, werden von pDC nicht exprimiert [26]. TLR7 Rezeptoren erkennen virale Einzelstrang-RNA, wohingegen TLR9 Rezeptoren auf unmethylierte CpG Motive in der DNA reagieren. Diese kommen hauptsächlich in der DNA von Viren und Mikroorganismen vor [26, 32].

Die beiden *Toll-like* Rezeptoren TLR7 und TLR9 werden nicht auf der Oberfläche, sondern endosomal exprimiert [32]. Es wird angenommen, dass Viren zuerst in das lysosomale Kompartiment internalisiert werden. Dort findet dann der Kontakt von DNA und Einzelstrang-RNA mit den TLR statt [33, 32].

TLR7 und TLR9 können allerdings auch auf körpereigene oder bakterielle Nukleinsäuren reagieren [32]. So kann TLR7 durch körpereigene mRNA stimuliert werden. Die TLR9 stimulierenden CpG Motive kommen auch in der DNA von Säugetieren vor, allerdings in wesentlich geringerer Konzentration als in der DNA von Mikroorganismen [32].

Im physiologischen Zustand werden die körpereigenen Nukleinsäuren jedoch nicht endosomal vorgefunden und können diese somit auch nicht aktivieren [32, 34]. Gelangen die körpereigenen Nukleinsäuren in das endosomale Kompartiment, kann dies

zum Verlust von Toleranz und zur Ausbildung von Autoimmunkrankheiten führen [32, 34].

Die Internalisierung körpereigener Nukleinsäuren ist teilweise abhängig von dem antimikrobiellen Peptid *Cathelicidin* (LL37) [35, 34]. *Cathelicidin* überführt körpereigene Nukleinsäuren durch Einschleusen in das endozytoplasmatische Kompartiment in einen aktiven Stimulus für die Rezeptoren TLR7 und TLR 9 [34].

Beide *Toll-Like* Rezeptoren geben ihr Signal über das Adaptermolekül MyD88 weiter, welches über eine Signalkette den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert [33, 36].

#### 1.1.3.4 Migration

PDC entstehen kontinuierlich im Knochenmark. Von dort wandern sie im Blut über die hochendothelialen Venolen (HEV) in die T-Zell reichen Zonen sekundärer lymphatischer Gewebe sowie über die Marginalzone in die Milz ein [22, 26, 37]. Dieser Migrationszyklus ist dem von B- und T-Zellen sehr ähnlich. Die Wanderung und räumliche Verteilung von pDC wird durch Chemokine und die Expression von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen beeinflusst [22, 26].

Das Anheften und das Rollen an dem Endothel hochendothelialer Venolen wird bei pDC wesentlich durch die Adhäsionsmoleküle E- und L-Selektin vermittelt [38, 37]. Im Blut zirkulierende pDC tragen E-Selektin (CD62E) und L-Selektin (CD62L) an ihrer Oberfläche. Der L-Selektin Ligand wird vom Endothel HEV konstitutiv exprimiert, der E-Selektin Ligand nur in entzündeten Lymphknoten [38, 37]. In pDC wird die Expression von L-Selektin nach Stimulation hochreguliert, nach Erreichen sekundärer lymphatischer Organe wird L-Selektin internalisiert [38, 20].

Es wird angenommen, dass die Diapedese von pDC durch die HEV chemokingesteuert erfolgt [39, 26]. PDC exprimieren eine Vielzahl unterschiedlicher Chemokinrezeptoren deren genaue Funktionen unzureichend geklärt sind [26, 39]. Bei der Diapedese wird der Interaktion zwischen dem von pDC exprimierten Chemokinrezeptor CXCR3 und dem Chemokin CXCL9 eine maßgebliche Rolle zugeschrieben [26, 39]. Das Chemokin CXCL9 wird von den HEV entzündeter Lymphknoten exprimiert [40, 39]. Es wird angenommen, dass die Lymphknoten-Migration von pDC sowohl lokal als auch durch systemische Entzündungen beeinflusst wird [26, 39]. Bereits in den Lymphknoten lokalisierte pDC sezernieren weitere inflammatorische Chemokine und könnten dadurch zu einer weiteren Anreicherung von pDC in Lymphknoten führen [41, 20].

### 1.1.3.5 Antigenpräsentation und Aktivierung von B- und T-Zellen

pDC können Antigene präsentieren und auch Zellen des erworbenen Immunsystems polarisieren [24, 2].

Das Präsentieren von Antigenen erfolgt mit Hilfe der MHC Moleküle Klasse I und Klasse II [24]. Während MHC Klasse I von allen Zellen exprimiert wird, ist die Expression von MHC Klasse II im Regelfall professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) vorbehalten [42].

Zur Präsentation durch MHC Moleküle müssen sich Antigene im richtigen Zellkompartiment befinden. MHC Klasse I Moleküle präsentieren Peptide aus dem Zytosol und dem Nukleus [42]. Die Peptide werden durch Proteasen gespalten und die Spaltprodukte durch einen Transporter in das endoplasmatische Retikulum geschleust. Dort kommen die Antigene mit MHC I in Kontakt und werden als MHC-Peptid-Komplexe an der Zelloberfläche präsentiert [42].

MHC Klasse II Moleküle präsentieren hauptsächlich Peptide extrazellulärer Antigene. Die extrazellulären Antigene werden von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen, endosomal gespalten und im Komplex mit MHC Klasse II an der Zelloberfläche präsentiert [42].

Die Präsentation endogener Antigene durch pDC ist sehr effektiv. Sie erfolgt sowohl konstitutiv als auch bei durch Viren infizierten Zellen und erfolgt hauptsächlich über MHC Klasse I [24].

Exogene Antigene werden nur in sehr geringem Umfang von pDC präsentiert, hier sind cDC wesentlich effektiver [26]. Um exogene Antigene präsentieren zu können, müssen diese zuerst internalisiert, prozessiert und auf MHC Klasse II geladen werden. Zur Internalisierung gibt es verschiedene Möglichkeiten: Phagozytose, Makropinozytose, Mikropinozytose und rezeptorvermittelt [43]. Ob pDC Phagozytose betreiben ist noch nicht vollständig aufgeklärt, aktuell widersprechen sich gängige Studien [26]. Allerdings ist klar, dass pDC lösliche Proteine aufnehmen [26]. Die Expression von MHC II und kostimulatorischer Moleküle ist bei naiven pDC im Vergleich zu cDC sehr gering, die Präsentation exogener Antigene somit ineffektiv [26].

Im Gegensatz zu pDC zeigen aktivierte pDC (*pDC-derived DC*) eine hohe Expression von MHC Klasse II und kostimulatorischer Moleküle, verlieren jedoch die Eigenschaft der IFN- $\alpha$  Sekretion [26, 44].

*PDC-derived DC* können sowohl  $CD4^+$  T-Lymphozyten als auch  $CD8^+$  T-Lymphozyten aktivieren [20, 30, 22, 31].

Bei  $CD4^+$  T-Lymphozyten induzieren *pDC-derived DC* stimulusabhängig entweder die Sekretion von  $T_H1$ - oder von  $T_H2$ -typischen Zytokinen und nehmen somit Einfluss auf die Immunantwort des angeborenen Immunsystems [20, 30, 22, 31].

PDC sind beim Menschen auch an der Differenzierung von B-Lymphozyten beteiligt. Durch die Sekretion der Zytokine IFN- $\alpha$  und IL-6 werden B-Lymphozyten aktiviert und differenzieren unter Mitwirkung weiterer Leukozyten zu Plasmazellen. Diese sezernieren Plasmazellen hauptsächlich IgG, weshalb vermutet wird, dass pDC vornehmlich B-Gedächtniszellen aktivieren [26, 45, 46].

## 1.2 Die TGF- $\beta$ Superfamilie

Um die korrekte Proliferation, Differenzierung und Integration von Zellen in mehrzelligen Organismen zu gewährleisten, bedarf es eines Systems der Zell-Zell Kommunikation. Beteiligt daran sind Zytokine, Hormone und Adhäsionsmoleküle. Die Superfamilie der TGF- $\beta$  („*transforming growth factor*“) Zytokine nimmt dabei eine wichtige Rolle ein. Sie umfasst über 40 strukturell verwandte, multifunktionelle Zell-Zell-Signalmoleküle [47].

Die Zytokine der TGF- $\beta$  Superfamilie, werden in zwei Subfamilien unterteilt. Die TGF- $\beta$ /Activin/Nodal Subfamilie und die BMP („*bone morphogenetic protein*“)/GDF („*growth and differentiation factor*“)/AMH (Anti-Müller Hormon) Subfamilie. Die Aufteilung erfolgt aufgrund von Sequenzähnlichkeiten und Übereinstimmungen im Signalweg [48].

Die Zytokinfamilie ist durch ihre molekulare Struktur gekennzeichnet. Die Zytokine bestehen aus einem Dimer zweier „Cystein Knoten“, bestehend aus jeweils sieben konservierten Cysteinresten. Die „Cystein Knoten“ werden durch eine intermolekulare Cysteinbrücken zu einem Dimer verbunden [49].

Zytokine der TGF- $\beta$  Superfamilie werden als Prä-Pro-Proteine synthetisiert. Am N-terminalen Ende befindet sich ein Signalpeptid für den sekretorischen Weg und ein Vorbereich für die korrekte Weiterverarbeitung. Nach Abspaltung dieser beiden Bereiche entsteht ein Fragment aus 110 bis 140 Aminosäuren. Durch Homo- oder Heterodimerisation erlangen die Fragmente ihre biologische Funktion [49].

Einige Zytokine, wie zum Beispiel TGF- $\beta$ , werden von den meisten Zelllinien produziert, andere, wie Myostatin, hingegen nur von sehr wenigen. Manche beeinflussen den Organismus von der frühen Embryonalentwicklung bis ins hohe Alter, während beispielsweise das Anti-Müller Hormon nur in einem sehr begrenzten Zeitraum der Embryonalentwicklung aufzufinden ist [47].

### 1.2.1 TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  ist beteiligt an einer Vielzahl unterschiedlicher biologischer Prozesse. Diese reichen von der fetalen Entwicklung über die Wundheilung bis zur Regulation des Immunsystems [50].

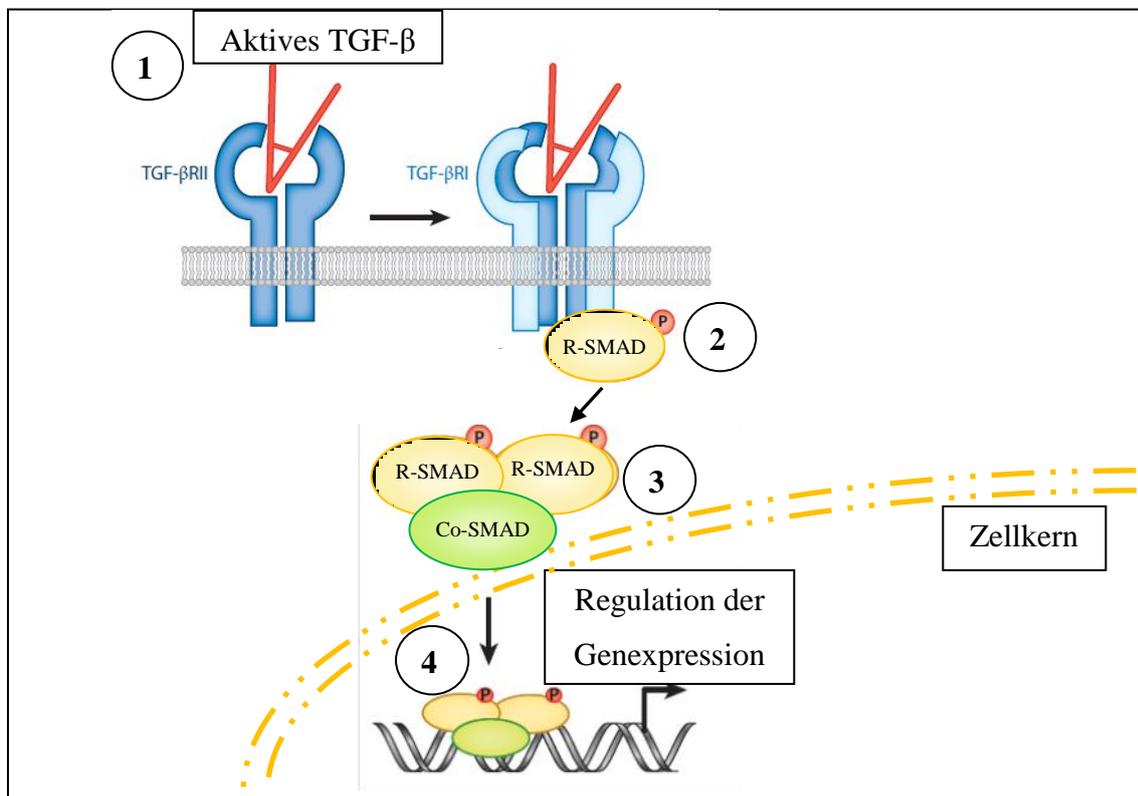
TGF- $\beta$  wird als aktives oder als inaktives Protein sezerniert. Die inaktive Form ist entweder nur mit dem *latency-associated* Protein (LAP) oder mit dem LAP und dem latenten TGF- $\beta$ -bindenden Protein (LTBP) verbunden. Diese Vorläuferkomplexe werden in die extrazelluläre Matrix eingelagert und können durch proteolytische Abspaltung der latenten Proteine aktiviert werden [51, 52].

In Säugetieren gibt es drei verschiedene Isoformen von TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3). Diese stimmen in der Aminosäuresequenz zu 60 bis 80% überein, werden aber durch verschiedene Gene kodiert [53, 52]. Experimente an *Knockout*-Mäusen deuten auf ungleiche Wirkungen der einzelnen Isoformen hin [53]. Wenn nicht anderweitig bezeichnet, wird in dieser Arbeit TGF- $\beta$  synonym für TGF- $\beta$ 1 verwendet.

#### 1.2.1.1 Der TGF- $\beta$ Signalweg

TGF- $\beta$  Liganden übermitteln ihr Signal durch einen Rezeptoren-Komplex mit Serin/Threonin-Kinase Aktivität [47, 54]. Der Rezeptoren-Komplex wird von je zwei transmembranären Typ I und Typ II Rezeptoren gebildet (heterotetramere Rezeptoreinheit). Die Typ I Rezeptoren werden nach Bindung eines Liganden von den Typ II Rezeptoren phosphoryliert, wodurch deren Kinasedomäne aktiviert wird [47, 54]. Es gibt bei Menschen sieben verschiedene Typ I und fünf Typ II Rezeptoren [47, 54]. Die auf die Rezeptoraktivierung folgende Signalkaskade ist von dem Wachstumsfaktor und den zugehörigen Rezeptoren abhängig [54]. Bei Kontakt mit den vielfältigen Liganden der TGF- $\beta$  Superfamilie verbinden sich letztere in unterschiedlichen Kombinationen miteinander, jedoch scheint die Signalwirkung nur von den Typ I

Rezeptoren abzuhängen [47, 54]. Drei der Typ I Rezeptoren übertragen Signale der TGF- $\beta$  Subfamilie. Die anderen vier Typ I Rezeptoren übertragen Signale der BMP Subfamilie [54].



**Abbildung 3: Der TGF- $\beta$  Signalweg**

(1) Aktives TGF- $\beta$  bindet an ein Dimer aus TGF- $\beta$ II Rezeptoren, das sich daraufhin mit einem weiteren Dimer aus TGF- $\beta$ I Rezeptoren verbindet. Der TGF- $\beta$  Rezeptorenkomplex kann die im Zytoplasma gelegene Domäne des TGF- $\beta$ I Rezeptors durch Phosphorylierung aktivieren. (2) Der aktivierte TGF- $\beta$ I Rezeptor bindet an ein R-SMAD und phosphoryliert dieses. (3) Die Phosphorylierten R-SMAD bilden einen Komplex mit einem Co-SMAD. (4) Nach Einschleusung in den Nukleus reguliert der Komplex zusammen mit Koaktivatoren und Korepressoren die Genexpression durch Bindung an die DNA. TGF- $\beta$  aktiviert auch andere, nicht SMAD abhängige Signalwege. Modifiziert nach Travis et al. 2014 [55]. Übernahme mit Genehmigung von RightsLink®.

Der aktivierte Typ I Rezeptor leitet das Signal über Phosphorylierung von Rezeptor-regulierten SMAD-Proteinen (R-SMAD) fort [54, 56]. Das phosphorylierte R-SMAD löst sich vom Rezeptor und bildet zusammen mit einem weiteren R-SMAD und einem *common mediator* SMAD (Co-SMAD) einen Komplex. Dieser SMAD-Komplex wandert in den Nukleus und bindet dort mit DNA-bindenden Proteinen und Promotoren an die DNA und beeinflusst die Expression von Genen [54, 56].

Die Aktivierung des SMAD-Signalweges löst intrazellulär einen negativen Rückkopplungsmechanismus aus. So wird durch die TGF- $\beta$  und BMP Signalkaskade die Transkription von inhibitorischen SMAD (I-SMAD) verstärkt. I-SMAD antagonisieren die Wirkung des TGF- $\beta$  und BMP Signalweges [54, 56]. Zusätzlich wird angenommen, dass sich der SMAD-Signalweg und andere Signalwege wechselseitig beeinflussen [56].

Der SMAD-Signalweg ist jedoch nicht für sämtliche TGF- $\beta$  Wirkungen auf die Zelle verantwortlich, da es auch SMAD unabhängige Wege gibt. Diese Signalwege sind im Gegensatz zum SMAD-Signalweg jedoch zellspezifisch und ihre biochemischen Verbindungen zu den aktivierten Rezeptoren bislang weitgehend unbekannt [47, 48].

Welche Gene durch den TGF- $\beta$  Signalweg letzten Endes reguliert werden ist von zell- und zyklusspezifisch vorhandenen Proteinen und Promotoren abhängig [54].

### 1.2.1.2 Die Regulation Dendritischer Zellen durch TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  ist an der Reifung von DC und der Regulation der von DC ausgeführten Immunantwort beteiligt. TGF- $\beta$  inhibiert die Reifung von DC und fördert die Bildung von DC mit unreifem Phänotyp [50]. TGF- $\beta$  hemmt bei reifen DC die Expression von MHC Klasse II Molekülen und von kostimulatorischen Molekülen, was die Fähigkeit zur Antigenpräsentation mindert. Ferner reduziert TGF- $\beta$  die durch proinflammatorische Zytokine (IL-1 und TNF- $\alpha$ ) ausgelöste DC-Reifung und IL-12 Produktion [50]. Bei *Knockout*-Mäusen, die keinen TGF- $\beta$ II Rezeptor exprimieren und somit unempfindlich sind für TGF- $\beta$  Signale, kommt es zu spontanen Multiorganentzündungen und Tod im Alter von 15 Wochen [57].

Im Gegensatz dazu sind Langerhanszellen zur Entwicklung und zur Ausbildung zellspezifischer Funktionen auf die Stimulation durch TGF- $\beta$  angewiesen [58]. In *Knockout*-Mäusen, die nicht zur Synthese von TGF- $\beta$  fähig sind, bilden sich keine Langerhanszellen. Weiter wird bei Langerhanszellen durch TGF- $\beta$  die Antigenverarbeitung und die Expression kostimulatorischer Moleküle gefördert [58].

Mit TGF- $\beta$  behandelte pDC sezernieren vermehrt IL-6 und polarisieren naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen vornehmlich zu T<sub>H</sub>17 Zellen anstatt zu regulatorischen T-Zellen [59].

### 1.2.1.3 Dendritische Zellen synthetisieren TGF- $\beta$

Immunhistologische Studien haben gezeigt, dass TGF- $\beta$  von DC in großen Mengen exprimiert wird [58]. In Gewebsschnitten, angefärbt mit polyklonalen Antikörpern gegen TGF- $\beta$ , sind DC und LC gut sichtbar [58]. TGF- $\beta$  wird ebenso von *in vitro* generierten DC aus menschlichem Nabelschnurblut synthetisiert [58]. PCR-Analysen haben allerdings gezeigt, dass im Blut zirkulierende reife CD83<sup>+</sup> DC TGF- $\beta$ 1 mRNA aber keine TGF- $\beta$ 2 mRNA synthetisieren [58]. Bei Mäusen wird TGF- $\beta$  in hohem Ausmaß von aus dem Knochenmark entstandenen CD11c<sup>+</sup>, CD86<sup>-</sup> unreifen DC exprimiert und in geringerem Umfang von reifen CD11c<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> DC [50].

Auch pDC können TGF- $\beta$  synthetisieren. Die TGF- $\beta$  mRNA-Expression von pDC *in vitro* ist abhängig von den TGF- $\beta$  Konzentrationen im Nährmedium. Bei steigenden TGF- $\beta$  Konzentrationen nimmt die Syntheseleistung zu. Die mit TGF- $\beta$  behandelten pDC besitzen die Fähigkeit zur Ausscheidung von aktivem TGF- $\beta$  [59].

Die Funktion des von DC synthetisierten TGF- $\beta$  ist weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Im physiologischen Ruhezustand führt die Präsentation von Antigenen durch unreife DC nicht zu T-Zell Aktivierung. Es ist vorstellbar, dass von DC sezerniertes TGF- $\beta$  auf parakrinem Wege zur Induktion von T-Zell Toleranz führt. Möglich wäre auch die Aufrechterhaltung des unreifen Phänotyps der DC über einen autokrinen Signalweg [50].

### 1.2.2 Der *left-right determination factor*

Der *Left-right determination factor* (Lefty) ist ein Signalmolekül der TGF- $\beta$  Superfamilie. Wie alle Wachstumsfaktoren der TGF- $\beta$  Superfamilie, wird Lefty vor der Aktivierung prozessiert. Das Lefty Vorläuferprotein ist 42 kDa groß, nach proteolytischer Spaltung entstehen Polypeptide mit 34 und 28 kDa [60, 61]. Bei Mäusen existieren drei verschiedene Isoformen, Lefty1, Lefty2 und Lefty3, wobei es sich bei Lefty3 mutmaßlich um ein Pseudogen handelt [62–64]. Die Gene von Lefty1 und 2 befinden sich auf Chromosom 1 [60]. Basierend auf der chromosomalen Lage und vorhandenen Transkriptionsvertärkern („*Enhancern*“) entspricht *murines* Lefty1 *humanen* LeftyB und Lefty2 entspricht LeftyA [63, 64]. Dies bedeutet jedoch nicht, dass beispielsweise LeftyB eine größere Ähnlichkeit zu Lefty1 als zu Lefty2 besitzt. Vielmehr wird angenommen, dass sich die unterschiedlichen Lefty-Proteine bei Maus

und Mensch jeweils separat aus einem einzelnen Lefty-Protein entwickelt haben [62, 64]. Lefty1 und Lefty2 werden beide aus vier, an denselben Stellen unterbrochenen Exons, zusammengesetzt. Die Aminosäuresequenzen der reifen Regionen von Lefty1 und Lefty2 sind stark konserviert, nur neun Aminosäuren sind in beiden Proteinen verschieden (97% Übereinstimmung). Die Proprotein Region ist hingegen lediglich zu 70% konserviert. Die N-terminal abgespaltenen Aminosäuresequenzen (RGKR) stimmen in beiden Wachstumsfaktoren überein, die C-terminal abgespaltene Sequenz von Lefty1, RQKR, ist bei Lefty2 durch die Sequenz RFER ersetzt. Sowohl die Prozessierung als auch die Sekretion von beiden Lefty Proteinen erfolgt zellspezifisch [65].

Beiden Lefty Proteinen fehlt die für die TGF- $\beta$  Superfamilie typische  $\alpha$ -Helix Struktur, welche zur Proteindimerisation benötigt wird, ebenso wie die für die intermolekulare Disulfidbindung benötigten Cysteinreste [66]. Daher wird angenommen, dass beide Lefty Proteine im Gegensatz zu den meisten Proteinen der TGF- $\beta$  Superfamilie als Monomer aktiv sind [66].

Namensgebend für Lefty ist dessen Rolle während der Embryonalentwicklung. Lefty wird in der linken Körperhälfte von Mäusen exprimiert und ist beteiligt an rechts-links Asymmetrien [65]. Die Expression der Lefty-Isoformen ist jedoch nicht identisch. Lefty1 wird hauptsächlich auf der linken Seite des *ventralen* Neuralrohrs exprimiert, Lefty2 auf der linken Seite des *lateralen* Mesoderms [65]. Bei Lefty1 *Knockout*-Mäusen findet sich eine Vielzahl von rechts-links Fehlpositionierungen innerer Organe, am häufigsten ein *Situs inversus thoracalis*. Die fehlende Expression von Lefty1 führt zur bilateralen Expression von Nodal, Lefty2 und Pitx2 (ein normalerweise nur links exprimiertes Homöobox Gen) [67]. Für Lefty1 wird deshalb angenommen, dass es die Expression von Lefty2 und Nodal auf die linke Seite beschränkt, während Lefty2 und Nodal ein Signal für „Linksseitigkeit“ darstellen [67]. Da beide Leftyproteine aber ansonsten in der Aktivität nicht zu unterscheiden sind und ähnliche Expressionsmuster aufweisen [68, 65], werden in dieser Arbeit die unterschiedlichen Isoformen verkürzt als Lefty bezeichnet.

Auch in Zellen außerhalb der Embryonalentwicklung wird Lefty exprimiert, beispielsweise in mesenchymalen Zellen und Fibroblasten sowie in hohen Konzentrationen von endometrialen Fibroblasten, kurz vor der Ablösung des Endometriums [69]. In anderen Geweben ist es in niedrigen Konzentrationen vorhanden. Zum Beispiel kann Lefty im Kolon, den Ovarien, den Hoden und dem

Pankreas nachgewiesen werden. Zudem kann es in bestimmten Tumorarten gefunden werden [69].

### 1.3 Wundheilung

Die Wundheilung ist ein komplexer biologischer Mechanismus, reguliert durch eine Vielzahl von Signalmolekülen. Die Wundheilung bei erwachsenen Menschen erfolgt durch funktionell minderwertiges Narbengewebe, wohingegen bei fetalen Wunden Funktionalität und Optik komplett wiederhergestellt werden. Der unterschiedliche Ablauf von fetaler und adulter Wundheilung ist nicht vollständig geklärt und Gegenstand wissenschaftlicher Forschung [70].

#### 1.3.1 Die Phasen der regulären Wundheilung

Die Wundheilung wird klassischerweise in drei Phasen eingeteilt: die exsudativ-entzündliche, die proliferative und die regenerative Phase [70].

Die exsudativ-entzündliche Phase beginnt mit der Blutgerinnung, wobei eine Matrix aus Thrombozyten und Fibrin entsteht. Durch Komplementaktivierung, freiliegendem subendothelialen Kollagen und beschädigten Zellen werden Thrombozyten, Fibroblasten und endotheliale Zellen zur Ausschüttung einer Vielzahl verschiedener Zytokine stimuliert. Dies führt zu Vasodilatation und Steigerung der Gefäßpermeabilität mit Einwanderung von neutrophilen Granulozyten. Diese phagozytieren Zellreste und sezernieren dabei Proteasen, Zytokine und freie Radikale [70, 71]. Nach zwei bis drei Tagen infiltrieren Monozyten die Wunde und differenzieren zu Gewebsmakrophagen. Auch diese phagozytieren zelluläre Ablagerungen. Zudem leiten sie durch die Produktion einer Vielzahl von Zytokinen (unter anderem: TGF- $\beta$ , Interleukin-1, *platelet derived growth factor*, *fibroblast growth factor*, *insulin-like growth factor*) die nächste Phase der Wundheilung ein [70, 71, 52].

Die proliferative Phase erfolgt zwei bis zehn Tage nach der Wundentstehung. Sie ist gekennzeichnet durch die Ablagerungen von extrazellulärer Matrix, Angiogenese und Reepithelisierung. Über das Blut werden Fibroblasten eingeschwemmt und bilden eine extrazelluläre Matrix, hauptsächlich bestehend aus Kollagen und Fibronectin. Einsprossende Kapillaren versorgen die Zellen mit Sauerstoff und Metaboliten. Das neu entstandene Gewebe hat ein körniges Aussehen und wird deshalb Granulationsgewebe

genannt. An der Wundoberfläche wird eine neue Epithelschicht von Keratinozyten gebildet, die aus den Wundrändern einwandern [70, 71, 52].

Die regenerative Phase beginnt circa zwei bis drei Wochen nach der Wundentstehung. Während dieser Phase schwächen sich die nach der Verletzung in Gang gekommenen Prozesse ab. Viele Zellen der Wundheilung begehen Apoptose und hinterlassen ein hauptsächlich aus extrazellulärer Matrix bestehendes Gewebe. Die Zusammensetzung des Kollagens wird umgewandelt, vom vorherrschenden Kollagen Typ III zu Kollagen Typ I. Zudem differenzieren Fibroblasten zu kontraktile Myofibroblasten und verkleinern durch Kontraktion das Wundgebiet [70, 71]. Narbengewebe bleibt jedoch immer mechanisch instabiler als unverletztes Gewebe. Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen werden nicht nachgebildet [52].

### **1.3.2 TGF- $\beta$ in der Wundheilung**

Bei der Wundheilung nimmt TGF- $\beta$  Einfluss auf die Regulation der Entzündung, der Angiogenese, der Proliferation von Fibroblasten, der Kollagensynthese und dem Umbau extrazellulärer Matrix [71, 51]. In Wundgewebe wird TGF- $\beta$  hauptsächlich von Thrombozyten, Monozyten und Fibroblasten abgeschieden [71]. Jedoch sezernieren auch weitere in Wunden vorkommende Zelltypen wie zum Beispiel Epithelzellen und Endothelzellen TGF- $\beta$  [51, 52]. Extrazelluläres TGF- $\beta$  wirkt durch Bindung an Rezeptoren der Zellmembran sowohl para- als auch autokrin [71, 51].

Es gibt drei Isoformen von TGF- $\beta$ . Diese werden in adulten sowie in embryonalen Wunden vorgefunden, jedoch unterscheiden sich Expression und biologische Aktivität der Isoformen [53]. Dies ist bemerkenswert, da adulte Wunden durch Narbengewebe ersetzt werden, embryonale Wunden hingegen narbenfrei verheilen [72]. Alle drei Isoformen werden als latente Vorläuferproteine sezerniert und müssen aktiviert werden bevor sie an den TGF- $\beta$  Rezeptor binden können [53].

TGF- $\beta$ 1 ist in den unterschiedlichen Geweben die am meisten verbreitete Isoform und die einzige, die in humanen Thrombozyten gefunden wird [51]. In der Wundheilung ist TGF- $\beta$ 1 die überwiegend vorgefundene Isoform [73]. Der Isoform werden wichtige Rollen bei der Inflammation, Angiogenese, Epithelbildung und Bindegewebsregeneration zugeschrieben [73].

TGF- $\beta$ 1 fördert als Chemokin die Migration neutrophiler Granulozyten, Makrophagen und Fibroblasten und verstärkt das zellgesteuerte Wunddebridement [52, 73]. Die

angelockten Zellen produzieren in späteren Wundstadien eigenes TGF- $\beta$ , dies kann zu einer späteren Überproduktion von TGF- $\beta$  führen [74, 52, 51]. In vitro konnte nachgewiesen werden, dass auch pDC nach Stimulation durch TGF- $\beta$  selbst zur Expression von TGF- $\beta$  angeregt werden [59].

Durch Hochregulation von Genen der extrazellulären Matrixformation (Fibronectin, Fibronectin-Rezeptor, Kollagen, Protease Inhibitoren) fördert TGF- $\beta$ 1 die Entstehung von Granulationsgewebe [73]. Darüber hinaus ist es an der Hochregulation des Wachstumsfaktors VEGF (*vascular endothelial growth factor*) beteiligt und begünstigt die Kontraktion von Wunden durch Fibroblasten [73]. Bei Keratinozyten fördert TGF- $\beta$ 1 die Migrationsfähigkeit und hemmt deren Proliferation [73].

TGF- $\beta$ 2 wird eine ähnliche Wirkung wie TGF- $\beta$ 1 zugeschrieben. Es fördert die Einwanderung inflammatorischer Zellen, die Ausbildung von Granulationsgewebe durch Steigerung der Angiogenese, die Ablagerung von Kollagen und somit die Narbenbildung [73].

Auch TGF- $\beta$ 3 fördert die Einwanderung inflammatorischer Zellen, die Migration von Keratinozyten und die Angiogenese [73]. Im Gegensatz zu TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 hemmt TGF- $\beta$ 3 jedoch die DNA-Synthese durch Keratinozyten [73]. Bei Wunden konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ 3 zu verminderter Ablagerung von Fibronectin, Kollagen I und III, zu verbesserter Architektur der Neodermis und zu reduzierter Narbenbildung führt [75]. Auch in intakter Epidermis konnte eine hohe Expression von TGF- $\beta$ 3 nachgewiesen werden, weshalb angenommen wird, dass TGF- $\beta$ 3 als Stoppsignal der anderen Isoformen dient [73].

Der Einwirkungszeitpunkt der TGF- $\beta$  Isoformen scheint Einfluss auf die Wundheilung zu haben: Während die Konzentrationen von TGF- $\beta$ 3 erst nach Tagen ansteigt, fällt gleichzeitig die Expression von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 schon wieder ab [74, 52, 51].

Aus hypertrophen Wunden isolierte Fibroblasten zeigen einen veränderten Phänotyp im Vergleich zu Fibroblasten aus normalen Wunden oder unverletzter Haut [53]. Die in hypertrophen Wunden vorgefundenen Fibroblasten synthetisieren vermehrt TGF- $\beta$ 1 mRNA und Protein [53]. Diese Fibroblasten weisen zudem eine anhaltende Expression der TGF- $\beta$  Rezeptoren auf. Demgegenüber fällt bei Fibroblasten aus normalen Wunden die Expression während der Regenerationsphase ab [53]. Bei Fibroblasten die aus hypertrophen Wunden isoliert werden, gibt es zudem Veränderungen in der TGF- $\beta$  Signalübertragung [53]. Die beiden R-SMAD, SMAD2 und SMAD3, werden vermehrt exprimiert und liegen in höherem Ausmaß phosphoryliert vor [53]. Der I-SMAD

SMAD7 hingegen wird im Gegensatz zu Fibroblasten gesunder Haut nach Stimulation durch TGF- $\beta$  nicht hochreguliert [53]. SMAD3 defiziente *Knockout*-Mäuse zeigen eine verbesserte Wundheilung mit geringeren Entzündungszeichen, schnellerer Reepithelisierung, vermindertem Granulationsgewebe und einem schmälern Narbengebiet [77]. Im Bleomycin Lungenfibrose-Modell zeigten SMAD3 defiziente *Knockout*-Mäuse eine reduzierte Typ I Prokollagen-mRNA Expression sowie einen milderen Fibrosierungsprozess [53].

Wundspannung ist ein weiterer an der Narbenbildung beteiligter Faktor. So steigert mechanische Belastung *in vitro* die Genexpression von TGF- $\beta$ 1, dessen Rezeptoren und die Expression von Typ I Prokollagen in normalen Fibroblasten der Haut. Es wird angenommen, dass diese vermehrte Expression die spannungsbedingte Narbenbildung fördert [51].

Zur physiologischen Wundheilung gehört auch der gesteuerte Zelluntergang. Die Apoptoserate und die Expression von mit Apoptose im Zusammenhang stehenden Genen sind bei Fibroblasten aus Keloid vermindert [51]. Interessanterweise scheint TGF- $\beta$  zu der reduzierten Apoptoserate beizutragen. So kann *in vitro* die Apoptoserate normaler Fibroblasten durch die Zugabe von TGF- $\beta$ 1 zum Kulturmedium reduziert werden. Umgekehrt kann die Rate apoptotischer Zellen in Keloid durch die Zugabe von gegen TGF- $\beta$ 1 gerichteten Antikörpern erhöht werden [51].

Zusammenfassend wird TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 eine Bildung von Narbengewebe und Keloid fördernde Wirkung zugesprochen [73]. TGF- $\beta$ 3 hingegen wirkt inhibitorisch auf die Narbenbildung und begünstigt eine bessere Struktur der extrazellulären Matrix [73].

#### **1.4 Zielsetzung und Vorgehensweise**

Die Zytokine der TGF- $\beta$  Superfamilie haben entscheidenden Einfluss auf die Zellproliferation, -migration und -differenzierung hämatopoetischer Stammzellen, DC und weiterer Zellarten [73, 94]. Unter anderem wird durch TGF- $\beta$ 1 die Differenzierung von Vorläuferzellen zu pDC gehemmt [94]. In der Wundheilung wird TGF- $\beta$  eine regulierende Wirkung zugesprochen [71].

pDC erfüllen unterschiedliche Funktionen im menschlichen Körper. Sie aktivieren und steuern das erworbene Immunsystem nach dem Eindringen von Viren und induzieren Toleranz gegen körpereigene Antigene [26]. Weitere Funktionen werden angenommen. Zuletzt konnte gezeigt werden, dass pDC sowohl Hautwunden als auch bei bakteriellen

Pneumonien die Lunge infiltrieren [78, 35]. Der Grund dieser Infiltration ist bislang unbekannt. Es sind jedoch wichtige Funktion anzunehmen, da gezeigt werden konnte, dass die Depletion von pDC zu einer Verlangsamung der Wundheilung bei Hautwunden führt [35].

Die Zielsetzung der Dissertation ist die Erstellung eines Transkriptions- und Expressionsmusters von Genen der TGF- $\beta$  Superfamilie in *murinen* pDC. Aufgrund der benötigten hohen Zellzahlen der seltenen pDC, sollte zuerst eine *in vitro* Kultur etabliert werden. Die *in vitro* generierten DC sollten durchflusszytometrisch sortiert und der Phänotyp anhand von zelltypischen Eigenschaften bestätigt werden.

Bei den *in vitro* expandierten pDC wird beabsichtigt, mit einem semiquantitativen PCR-*Mikroarray* ein Genexpressionsprofil der TGF- $\beta$  Superfamilie zu erheben und die Ergebnisse an pDC der Milz *ex vivo* zu validieren.

Um das Verhalten von pDC in Wunden und bei Infektionen zu simulieren, sollte die Genexpression auch unter verschiedenen pathologischen Versuchsbedingungen untersucht werden.

Ergebnisse der Transkriptionsanalysen sind auf Proteinebene zu bestätigen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Zubehör

**Tabelle 1: Geräte und Zubehör**

<b>Geräte</b>	<b>Typ und Zubehör</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Brutschrank</b>	HERAcell 240 CO <sub>2</sub> Inkubator	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, D
<b>Durchflusszytometer</b>	BD FACSCanto II + FACSDiva Software V6.1.3 BD FACSAria III + FACSDiva Software V6.1.3	BD Biosciences, Heidelberg, D BD Biosciences, Heidelberg, D
<b>Elektr. Pipettierhilfe</b>	PIPETBOY acu	IBS Integra Biosciences, Fernwald, D
<b>ELISA Reader</b>	TECAN Sunrise + Magellan Software V6.5	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, D
<b>ELISA Washer</b>	TECAN Hydroflex Verwendet?	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, D
<b>MidiMACS™ Separator</b>	Multistand/Magnethalterung für Säulchen	Miltenyi Biotec, Bergisch- Gladbach, D
<b>Mikroskope und Kamera</b>	Leitz Leica DM IRB  Nikon-Eclipse (TE 2000-E) + NIS-Elements Software	Biomed, Wetzlar, D Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D Nikon GmbH, Düsseldorf, D
<b>MultiStand AutoMACS</b>	Separator + Appendix Software V1.12	Miltenyi Biotec, Bergisch- Gladbach, D

<b>Geräte</b>	<b>Typ und Zubehör</b>	<b>Hersteller</b>
<b>PCR-System</b>	Real-Time PCR Step One Plus RT-PCR-System	Applied Biosystems, Foster City, USA
<b>Pipetten</b>	2 µl – 1000 µl	Eppendorf, Wien, A
<b>Spektralphotometer</b>	NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington , USA
<b>Statistikprogramm</b>	Graphpad Prism 6.01	Graphpad Software Inc. San Diego, USA
<b>Sterilbank</b>	Heraeus Klasse 2 TypH	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D
<b>Thermozykler</b>	Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, USA
<b>Waagen</b>	AE 100 S/9 und PJ 6000/9 Digitalwaage TP-500	METTLER-TOLEDO, Kirchheim, D DIPSE Digitalwaagen, Oldenburg, D
<b>Wasserbad</b>	ED Klasse I	Julabo Labortechnik, Seeibach, D
<b>Zählkammer</b>	Neubauer 0,0025 mm <sup>2</sup> / 0,1 mm	Brand GmbH, Schwerin, D
<b>Zentrifugen</b>	Mikro 20 Rotina 380R Biofuge primo	Hettich, Tuttlingen, D Hettich, Tuttlingen, D Heraeus Instruments, Hanau, D

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterial**

<b>Material</b>	<b>Typ und Zubehör</b>	<b>Hersteller</b>
FACS-Röhrchen	5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Falconröhrchen	15 und 50 ml (Polypropylen)	BD Labware, Le Pont De Claix, F

<b>Material</b>	<b>Typ und Zubehör</b>	<b>Hersteller</b>
Glaspipetten	2 – 25 ml	Hirschmann, Eberstadt, D
Kanülen	BD Microlance TM 3 20G x ½ (0,9 mm x 40 mm)	BD, Heidelberg, D
MACS Separationssäulen	Large Cell Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch- Gladbach, D
Skalpell	Feather Disposable Scalpel No. 24	Feather, Osaka, Japan
Sterile Tupfer	Pur-Zellin sterile Tupfer 4 x 5 cm	PAUL HARTMANN GmbH., Wiener Neudorf, AU
Sterilfilter	0,22 µM	Sartorius, Göttingen, D
Zellkulturplatten, -schalen und -flaschen	96-well Platte flatbottom  96-well Platte roundbottom  Advanced TC Zellkulturflasche, 250 ml, 75 cm <sup>2</sup> 24-well PureCoat Platte Amin, flatbottom	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D BD Labware, Le Pont De Claix, F BD Labware, Le Pont De Claix, F
Zellsiebe	40 und 70 µM (Nylon)	BD, Erembodegem, B

### 2.1.3 Versuchstiere

**Tabelle 3: Versuchstiere**

<b>Stamm</b>	<b>Zulieferer</b>	<b>Charakteristiken</b>
129S2/SvPasCrl	Charles River Laboratories, Sulzfeld, D	Inzucht-Stamm
C57BL/6NCrl	Charles River Laboratories, Sulzfeld, D	Inzucht-Stamm

### 2.1.4 Fluorochrome mit Extinktionswerten

Für die Zellfärbungen und FACS-Analysen wurden die folgenden Fluorochrome verwendet:

PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Tandemkonjugat aus Phycoerythrin und dem Cyanin Farbstoff 7
PerCPCy5.5	Tandemkonjugat aus Peridinin Chlorophyll Protein und dem Cyanin Farbstoff 5
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Tandemkonjugat aus Allophycocyanin und dem Cyanin Farbstoff 7

**Tabelle 4: Verwendete Fluorochrome mit Extinktions- und Emissionswerten**

Fluorochrom	Extinktion (nm)	Emission (nm)
APC	650	660
APC-Cy7	650;755	767
PE	480;565	578
PE-Cy7	488;532;561	767
PerCPCy5.5	490	695

### 2.1.5 Antikörper

**Tabelle 5: Verwendete Antikörper und Farbstoffe für die FACS-Messungen**

Antikörper	Farbstoff	Klon	Konz.	Cat.no.	Hersteller
CD45R/ B220	PE	RA3-6B2	0,2 mg/ml	553090	BDBioscience, Heidelberg, D
CD11c	PE-Cy7	N418	0,2 mg/ml	117317	Biologend, Uithoorn, NL
CD11b	PerCP/Cy5.5	M1/70	0,2 mg/ml	101227	Biologend, Uithoorn, NL
120G8	APC	120G8.04	0,2 mg/ml	DDX039 0	Imgenex, San Diego, USA
CD45	APC Cy7	30-F11	0,2 mg/ml	103116	Biologend, Uithoorn, NL

<b>Antikörper</b>	<b>Farbstoff</b>	<b>Klon</b>	<b>Konz.</b>	<b>Cat.no.</b>	<b>Hersteller</b>
Isotype <i>Rat</i> IgG 2 $\alpha$ κ	APC	eBR2a	0,2 mg/ml	1743218 1	eBioscience, Frankfurt, D
Isotype <i>Rat</i> IgG 2 $\alpha$ κ	PE	R35-95	0,2 mg/ml	553930	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Isotype Arm. Hamster IgG,	PE-Cy7	HTK888	0,2 mg/ml	400921	Biologend, Uithoorn, NL

### 2.1.6 *Beads*

**Tabelle 6: Compensation Beads (FACS-Kompensation)/MACS Micro-beads**

<b>Beads</b>	<b>Cat.no</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Mouse Ig,κ Neg. Control Compensation Particles Set	552843	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
Anti-Rat and Anti-Hamster Ig,κ Neg. Control Compensation Particles Set	552845	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
autoMACS Pan DC Micro beads (mouse)	130-092-465	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D

### 2.1.7 *Chemikalien*

**Tabelle 7: Verwendete Chemikalien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Cat.no.</b>	<b>Hersteller</b>
Aqua ad injectabilia	6724092.00.00	B. Braun, Melsungen, D
DMSO	472301	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ethanol (70 %, 99,9 %)	T86.8, P076.1	Roth, Karlsruhe, D
FACS Clean	340345	BD Bioscience, Heidelberg, D
FACS Flow	342003	BD Bioscience, Heidelberg, D
FACS Shutdown Solution	334224	BD Bioscience, Heidelberg, D
FCS Gold	A15-649	PAA Laboratories, Pasching, A

<b>Chemikalien</b>	<b>Cat.no.</b>	<b>Hersteller</b>
HBSS	H15-009	PAA Laboratories, Pasching, A
HEPES	15630	Invitrogen, Darmstadt, D
Isofluran	HDG9623	Baxter GmbH, Unterschleißheim, D
Nicht-Essentielle Aminosäuren	M7145	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Normales Maus Serum	01-6501	Invitrogen, Darmstadt, D
ODN 2216	t1rl-2216	Invivogen, San Diego, USA
PBS	P04-36500	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D
Penicillin/Streptomycin Lösung (50 µg/ml)	P11-010	PAA Laboratories, Pasching, D
RPMI 1640 Medium	E15-039	PAA Laboratories, Pasching, A
Sodium-Pyruvat, (110 mg/ml)	11360	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypanblau	73K2420	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
α- MEM mit GlutaMAX	32561	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	M7522	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

### 2.1.8 Zytokin- und Proteinfärbung / ELISAs

**Tabelle 8: Verwendete Zytokin und Proteinfärbung / ELISAs**

<b>Kit</b>	<b>Cat.no</b>	<b>Hersteller</b>
ELISA Kit for Left/Right Determination Factor 1 (LEFTY1)	SEC175Mu	USCN Life Science Inc, Wuhan, China
ELISA MAX <sup>TM</sup> Standard Set IFN-γ	430801	Biolegend, San Diego, USA
ELISA MAX <sup>TM</sup> Standard Set TNF-α	430901	Biolegend, San Diego, USA
Flow Cytomix Basic Kit mouse	BMS8440FF	eBioscience, Frankfurt, D
Flow Cytomix Simplex IFN- α mouse	BMS86027FF	eBioscience, Frankfurt, D

### 2.1.9 Assays und Primer

**Tabelle 9: Verwendete Assays und Primer**

<b>Kit</b>	<b>Cat.no</b>	<b>Hersteller</b>
Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads	27-9264-01	GELifesciences, Buckinghamshire, GB
RNeasy Mini Kit	74104	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RT <sup>2</sup> Nano PreAmp cDNA-Synthesis Kit	330451	SABiosciences, Frederick, USA
RT <sup>2</sup> PreAMP cDNA Synthesis Primer Mix - Mouse TGFb / BMP Signaling Pathway	PBM-035	SABiosciences, Frederick, USA
RT <sup>2</sup> Profiler™ PCR Array - Mouse TGFb / BMP Signaling Pathway	PAMM-035Z	SABiosciences, Frederick, USA
RT <sup>2</sup> SYBR Green qPCR Master Mix	330520	SABiosciences, Frederick, USA
Software: RT <sup>2</sup> Profiler PRC Array Data Analysis Version 3.5		SABiosciences, Frederick, USA

### 2.1.10 Rekombinante Proteine

**Tabelle 10: Verwendete rekombinante Proteine**

<b>Rekombinantes Protein</b>	<b>Cat.no</b>	<b>Hersteller</b>
FLT-3 Ligand	130-097-372	Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach, D

### 2.1.11 Puffer und Medien

Zellkultur-Medium:

- RPMI 1640
- 10 % FCS
- 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
- 1 % HEPES
- 1 % Nicht-Essentielle Aminosäuren
- 1 % Natrium-Pyruvat

- $5 \times 10^{-5}$  M 2- $\beta$ -Mercaptoethanol

Zellstimulations-Medium:

- RPMI
- 1 % Penicillin / Streptomycin
- 10 % FCS

Puffer den MACS *Sort*:

- PBS/EDTA/BSA-Puffer:
- 1 x PBS
- 2mM EDTA
- 0,5 % (w/v) BSA
- 0,2  $\mu$ m filtriert

PBS/EDTA-Puffer (*Running*-Puffer für das MACS-Gerät):

- PBS
- 2mM EDTA

Erythrozyten-Lyse Puffer:

- 155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$ , 10 nM EDTA, pH-7,4 ; entspricht :
  - 8,2 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (MW: 53,49)
  - 1,0 g  $\text{KHCO}_3$  (MW: 100,12)
  - 3,7 mg EDTA-Na-Salz (Titriplex® III) (MW: 372,24)
  - Einen Liter aqua dest. hinzufügen und pH-Wert auf 7,4 einstellen; steril filtrieren.

Verdau-Puffer je Lunge (auf 37°C vorgewärmt)

- 5 ml RPMI / 10% FCS / 1% Penicillin-Streptomycin Medium
- 70  $\mu$ l Collagenase A (Roche)
- 5  $\mu$ l DNase (Roche)

Assay Diluent:

- 1 % BSA in PBS

*Klebsiella*-Einfriermedium:

- 32,5 ml Glycerol
- 5 ml  $\text{MgSO}_4$  10mM
- 1,25 ml TRIS 1M
- Ad 11,25 ml Aqua dest.

### *Klebsiella*-Kulturmedium

- 1 Röhrchen BBL™ Todd Hewitt Broth
- 1 ml 5 % Hefeextraktlösung

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Versuchstiere**

Die Mäuse wurden von Charles River, Sulzfeld, D bezogen und in die Tierhaltung der Justus-Liebig Universität Gießen aufgenommen. Es wurden Mäuse der Stämme C57BL/6N und 129SV verwendet. Das Tialter betrug 7 bis 14 Wochen. Die Untersuchungen der Gewebeproben erfolgten im Rahmen der Genehmigungen GI 20/8 Nr. #25/2012, #75/2011 sowie #453\_M.

### **2.2.2 Zellisolation**

#### **2.2.2.1 Isolation *muriner* Knochenmarkszellen**

Die Tötung der Tiere erfolgte mit Isofluran. *Femur* und *Tibia* wurden unter sterilen Bedingungen exenteriert. Nach Entfernung der Epiphysen wurden die markhaltigen Diaphysen mit HBSS durchspült. Die gewonnene Zellsuspension wurde zentrifugiert (7 Minuten, 4° Celsius, 500 g) und der Überstand abgekippt. Das verbleibende Zellpellet wurde zur Erythrozytenlyse 2 Minuten in 2 ml Ammoniumchlorid resuspendiert. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit HBSS. Hiernach wurden die Zellen in das Zellkultur-Medium überführt (2 Mio. Zellen/ml) und durch ein 70 µm Zellsieb (*Cell Strainer*) filtriert.

#### **2.2.2.2 Herstellung einer Zellsuspension aus *murinen* Milzen**

Die Tötung der Tiere erfolgte mit Isofluran. Die Milz wurde unter sterilen Bedingungen exenteriert. Anschließend wurde die Milz mit dem Skalpell zerkleinert und unter Anwendung von schwachem mechanischen Druck durch ein 40 µm Zellsieb (*Cell Strainer*) gepresst. Das Zellsieb wurde hiernach mit HBSS durchspült. Die gewonnene Zellsuspension wurde zentrifugiert (7 Minuten, 4° Celsius, 500 g) und der Überstand

abgekippt. Das verbleibende Zellpellet wurde zur Erythrozytenlyse 2 Minuten in 2 ml Ammoniumchlorid resuspendiert. Anschließend folgten zwei Waschschrift mit HBSS.

### **2.2.2.3 Herstellung einer Zellsuspension aus murinen Lungen mit *Klebsiella* Pneumonie**

Lungengewebsproben von *K. pneumoniae* infizierten Mäusen [78, 99] wurden zerkleinert und eine Stunde in Verdau-Puffer inkubiert. Im Anschluss wurde durch Filtration durch ein 70 µm Zellsieb (*Cell Strainer*) eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die gewonnene Zellsuspension wurde zentrifugiert (7 Minuten, 4° Celsius, 500 g) und der Überstand abgekippt. Das verbleibende Zellpellet wurde zur Erythrozytenlyse 2 Minuten in 2 ml Ammoniumchlorid resuspendiert. Anschließend folgten zwei Waschschrift mit HBSS.

### **2.2.3 Die Zellkultur**

Das Versuchsprotokoll beruht auf Erkenntnissen, die aus Vorversuchen zur Optimierung der Kulturbedingungen gewonnen wurden. Für die Zellkultur wurden aus dem Knochenmark isolierte Zellen verwendet (siehe Kapitel 2.2.2.1). Die dort gewonnene Zellsuspension ( $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml) wurde in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 µl FLT3-Liganden (*FMS-like tyrosine kinase 3*) je ml Kultur. Die Kultivierung der Zellen fand in einem Brutschrank bei 37° C mit 5 % CO<sup>2</sup> und 95 % Luftfeuchtigkeit statt. Nach 4 Tagen Inkubation wurde ein Teilmedienwechsel durchgeführt. Dabei wurde die Hälfte des Volumens aus der Kulturflasche entnommen, zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das entstandene Zellpellet wurde in neuem Zellkulturmedium resuspendiert und zurück in die 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche überführt. Es wurde 1 µl FLT3-Ligand je ml Kultur hinzugegeben. Nach 7 Tagen wurde die Zellsuspension aus der Kulturflasche entnommen und mit demselben Volumen HBSS nochmals durchgespült. Die Zellsuspension wurde im Anschluss zentrifugiert (7 Minuten, 4° Celsius, 500 g) und der Überstand dekantiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 200 µl HBSS je ml Zellkultur aufgenommen.

## 2.2.4 Zellzahlbestimmung in der Neubauer Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellsuspensionen zentrifugiert (7 Minuten, 4° Celsius, 500 g), der Überstand dekantiert und das Pellet in 200 µl HBSS resuspendiert. 10 µl Zellsuspension wurden mit 90 µl einer Trypanblau-Lösung versetzt. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer (0,1 mm x 0,0025 mm<sup>2</sup> pro Kleinstquadrat) durch Auszählen von 4 Großquadraten bestimmt.

Die Gesamtzellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl der Ausgangslösung} = \text{Durchschnittliche Zellzahl je Großquadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnung (5)} \times \text{Volumen}$$

## 2.2.5 Durchflusszytometrische Methoden

### 2.2.5.1 *Magnetic activated cell sorting (MACS)*

Zur Isolierung von DC der Milz wurde die magnetische Zellseparation eingesetzt. Bei der magnetischen Zellseparation werden spezifische Antikörper verwendet, die an elektromagnetische Mikropartikel (*Microbeads*) gekoppelt sind. Die mit den Antikörpern markierten Zellen können in einer magnetischen Säule gebunden werden. Nicht markierte Zellen werden nicht gebunden und passieren die Säule. Dadurch kann eine Selektion der Zellen aufgrund ihrer Oberflächenantigene erzeugt werden.

Folgendes Set wurde verwendet: autoMACS *microbeads* (mouse) Cat. No. 130-092-465, Miltenyi Biotec. Die *microbeads* des Sets sind gegen CD11c und mPDCA-1 gerichtet. Färbung und Sortierung wurden entsprechend der Angaben des Herstellers umgesetzt.

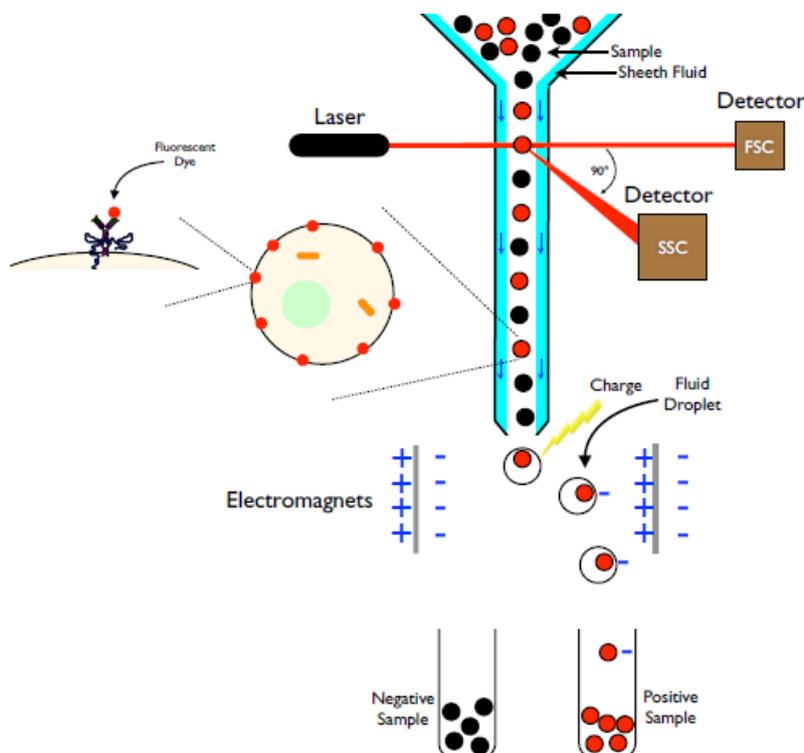
### 2.2.5.2 *Fluorescence activated cell sorting (FACS)*

Das Durchflusszytometer ermöglicht die qualitative und quantitative Untersuchung verschiedener Zellpopulationen. Die Zellen werden hierbei in einem Flüssigkeitsstrahl einzeln und mit hoher Geschwindigkeit an Lasern verschiedener Wellenlängen vorbeigeführt. Die Zellanalyse basiert auf der Lichtemission fluoreszenzmarkierter

Zellen. Bei den Lichtemissionen ist zwischen Fluoreszenzlicht und Streulicht zu unterscheiden.

Beim Streulicht wird zwischen Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*) und Seitwärtsstreulicht (*Sideward Scatter*) differenziert. Das Vorwärtsstreulicht ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und ist von der Zellgröße abhängig. Das Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel. Es ist abhängig von der Granularität und Struktur der Zelle. Das Fluoreszenzlicht entsteht durch Zellbestandteile selbst oder durch über Antikörper an die Zelle gebundene Fluoreszenzfarbstoffe. Auf diese Weise können Zellen durchflusszytometrisch nach Größe, Form, Granularität und Färbung unterschieden werden.

Zur Sortierung von Zellpopulationen werden die in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl befindlichen Zellen durch Vibration auf sehr kleine Tröpfchen verteilt. Jedes Tröpfchen enthält anschließend nur eine Zelle. Die Zelltröpfchen werden durchflusszytometrisch analysiert, elektrisch polarisiert und entsprechend der Ladung sortiert.



**Abbildung 4: Durchflusszytometrischer Zellsortierung**

Die zu untersuchenden Zellen werden durch einen Mikrokanal einzeln an einem Laser vorbeigeführt. Detektoren messen das dabei entstehende Streulicht und das emittierte Fluoreszenzsignal. Durch Vibration

wird der Flüssigkeitsstrahl anschließend in einzelne Tröpfchen mit je einer Zelle als Inhalt aufgeteilt. Die einzelnen Tröpfchen werden im Anschluss an einer Elektrode, abhängig von den vorher gemessenen Lichtsignalen, polarisiert und durch ein elektrisches Feld in verschiedene Gefäße gelenkt. SSC: *sideward scatter*, FFC: *forward scatter*. Modifiziert nach Sabban 2011 [79]. Grafik mit Creative Commons Lizenz 2.0 UK.

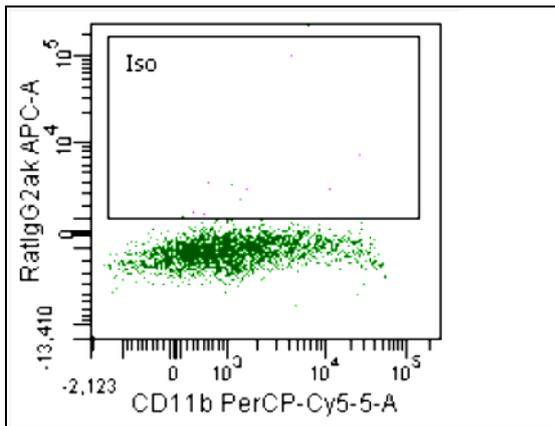
### **Zellfärbung und durchflusszytometrische Analyse**

Die Färbung der zu analysierenden Zellen erfolgte nach einem einheitlichen Protokoll. Die Zellsuspension für die durchflusszytometrische Analyse wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das gefüllte Röhrchen wurde zentrifugiert (7 Minuten, 4° Celsius, 500 g) und der Überstand dekantiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 2 ml HBSS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit anschließender Aufnahme von je 8 Mio. Zellen in 100 µl HBSS. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu reduzieren, wurden 10 % Mausserum hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde hiernach für 10 Minuten im Kühlschrank (6°C) gelagert.

Es folgte die Färbung mit den antikörpergebundenen Farbstoffen:

Antikörper	Farbstoff	Verwendete Konzentration
120G8	APC	0,8 µl/100 µl
CD45R/B220	PE	0,8 µl/100 µl
CD11c	PE-Cy7	0,8 µl/100 ml
CD11b	PerCy-Cy5.5	1,5 µl/100 ml
CD45	APC Cy7	0,8 µl/100 ml

Die Zellsuspension wurde für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln gefärbt. Hinterher wurde ein Waschschrift durchgeführt. Das entstandene Pellet wurde mit 1 ml Sortpuffer je 10<sup>6</sup> Zellen aufgefüllt und mit dem Vortexmischer geschüttelt. Vor der FACS-Analyse wurden die Zellen durch ein 40 µl Zellsieb (*Cell Strainer*) in ein FACS-Röhrchen gegeben. Isotypkontrollen wurden mit den Farbstoffen APC, PE und PE-Cy7 durchgeführt.



**Abbildung 5: Isotypkontrolle**

Dargestellt ist die fluoreszenzzytometrisch bestimmte, unspezifische Bindung von *Rat*-IgG2-Antikörper an das 120G8 Antigen *in vitro* expandierter pDC. Das Ausmaß unspezifischer Bindungen ist gering.

### Zellsortierung

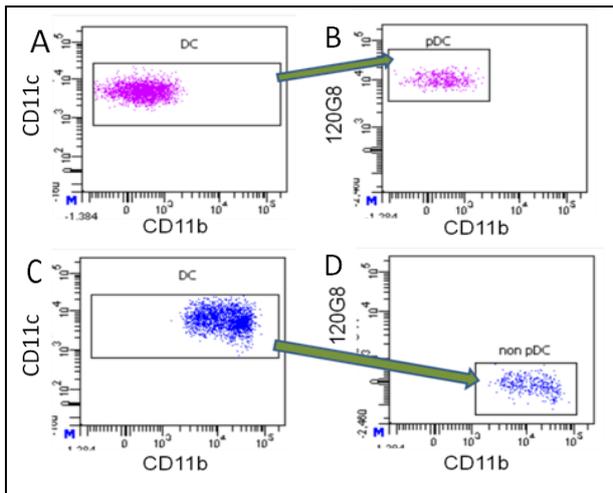
Zur genaueren Untersuchung der DC-Subpopulationen wurden die Zellpopulationen voneinander getrennt. Zellisolation und -färbung erfolgte nach Protokoll. Die Zellpopulationen wurden in mit 2 ml Zellstimulations-Medium befüllte FACS-Röhrchen sortiert. Die mit sortierten Zellen befüllten FACS-Röhrchen wurden zentrifugiert (7 Minuten, 4° Celsius, 500 g) und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden je  $2 \cdot 10^5$  Zellen in 200  $\mu$ l des Zellstimulations-Medium aufgenommen.

Bei Dendritischen Zellen aus Milz und Kultur wurden 2 Subpopulationen unterschieden:

pDC:  $CD11c^+$ ,  $CD45^+$ ,  $120G8^+$ ,  $CD45R/B220^+$ ,  $CD11b^{neg/low}$   
*non*-pDC:  $CD11c^+$ ,  $CD45^+$ ,  $120G8^{neg}$ ,  $CD45R/B220^{neg}$ ,  $CD11b^+$

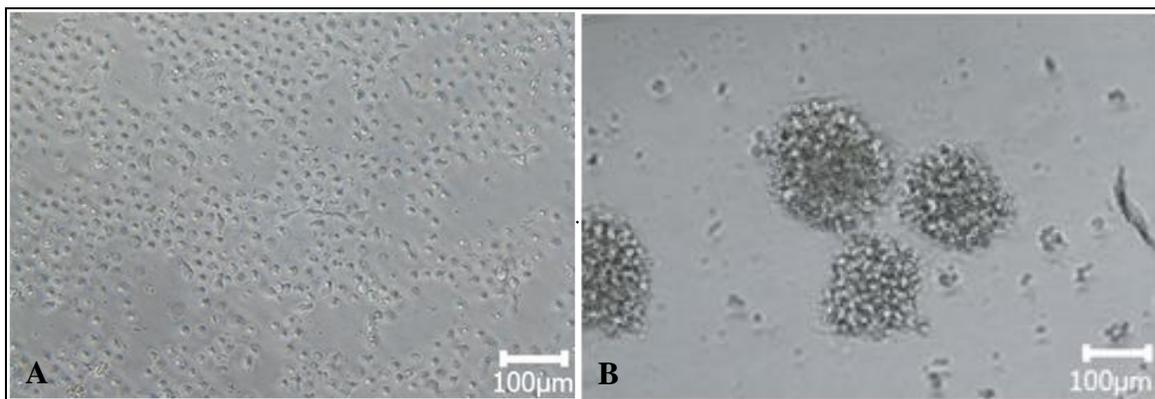
Die Lungengewebssuspension aus mit *K. pneumoniae* infizierten Mäusen wurde wie von Hackstein et al. beschrieben gesortet [78, 99]. Zusammengefasst wurden DC der Lunge als  $CD45^+$ ,  $CD11c^+$ ,  $Siglec-F^{neg}$ ,  $NK1.1^{neg}$  definiert. Es erfolgte eine weitere Unterteilung in 4 Subpopulationen:

pDC:  $120G8^+$ ,  $CD11b^{neg}$   
 CD103<sup>+</sup> DC:  $CD103^+$ ,  $MHCII^+$   
 CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>neg/low</sup> DC:  $CD103^{neg}$ ,  $CD11b^+$ ,  $MHCII^{neg/low}$   
 CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> DC:  $CD103^{neg}$ ,  $CD11b^+$ ,  $MHCII^+$



### Abbildung 6: Phänotypanalyse nach durchflusszytometrischer Zellsortierung

Die sortierten pDC und *non*-pDC wurden erneut durchflusszytometrisch analysiert und deren Reinheitsgrad bestimmt. Hier dargestellt ist die Analyse der Marker CD11c, CD11b und 120G8. **A+B** pDC der Milz, Reinheit 99,9% **C+D** *non*-pDC der Milz ( $CD11c^+CD45^+120G8^{neg}CD45R/B220^{neg}CD11b^+$ ), Reinheit 99,6%.



### Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahmen von DC an Tag 1 *post-sort*

(A) Einzeln liegende pDC (B) In Klustern angeordnete *non*-pDC ( $CD11c^+CD45^+120G8^{neg}CD45R/B220^{neg}CD11b^+$ ); Lichtmikroskopische Aufnahmen bei 400-facher Vergrößerung

## 2.2.6 Herstellung eines *Klebsiella pneumoniae* Lysates

Die Bakterienkonzentration des *Klebsiella pneumoniae* Stocks wurde mittels McFarland Standard auf  $10^9$  Zellen je ml eingestellt. Die Zellen wurden in 0,9 % NaCl-Lösung aufgenommen. Die gewonnene Suspension wurde anschließend bei 65° C im Heizblock inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -20° C. Der Ausschluss infektiöser Bakterien im Lysat fand durch Ausplattieren auf MacConkey Agar statt.

### 2.2.7 Zellstimulation

Je  $10^6$  Zellen pDC oder *non*-pDC wurden in 200  $\mu$ l Zellstimulations-Medium aufgenommen. Die Stimulation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37° C mit 5 % CO<sup>2</sup> und 95 % Luftfeuchtigkeit. Für das *Microarray* wurden die Zellen 7 Stunden stimuliert, für Proteinanalysen 24 Stunden.

**Tabelle 11: Verwendete Stimulanzen**

Stimulans	Verwendete Lösungsmenge	Arbeitskonzentration
ODN 2216: 1 mg / ml gelöst in H <sup>2</sup> O	1 $\mu$ l / 200 $\mu$ l Well	5 $\mu$ g / ml
PMA / Ionomycin:		
1. PMA: 50 $\mu$ g / ml gelöst in DMSO	nach 1 : 10 Vorverdünnung mit H <sub>2</sub> O 2 $\mu$ l je 200 $\mu$ l Well	50 ng / ml
2. Ionomycin: 1 mg / ml gelöst in H <sub>2</sub> O	nach 1 : 10 Vorverdünnung mit H <sub>2</sub> O 2 $\mu$ l je 200 $\mu$ l Well	1 $\mu$ g / ml
Klebsiella Lysat:	1 : 100	10 $\mu$ l / ml

Bei ODN 2216 handelt es sich um Oligodesoxynukleotide mit unmethylierten CpG-Motiven (Desoxycytidin – Phosphat – Desoxyguanosin) in spezifischer Sequenz. ODN 2216 induziert die Reifung von pDC und regt diese zu der Produktion großer Mengen von IFN- $\alpha$  an [100]. Die Aktivierung erfolgt über den TLR9-Rezeptor [32]. Es wird angenommen, dass das molekulare Muster von ODN 2216 durch pDC als Zeichen einer viralen Infektion interpretiert wird [100].

### 2.2.8 *Fluorescent Bead Assay* zur Quantifizierung der IFN- $\alpha$ Sekretion

pDC sind IFN- $\alpha$  produzierende Zellen [37]. Zur Validierung der Ergebnisse aus Kultur und Sortierung wurde die IFN- $\alpha$  Produktion von DC nach Stimulation mit ODN2216 gemessen. Dazu wurden die IFN- $\alpha$  Konzentration der Überstände nach *in vitro* Stimulation ausgewertet. Es wurde ein *Fluorescent Bead Assay* verwendet. Bei diesem *Fluorescent Bead Assay* sind „Mikrokügelchen“ (*Beads*) mit spezifischen Antikörpern gegen IFN- $\alpha$  beschichtet. Die *Beads* werden nun zu der Probe hinzugegeben. Befindet sich IFN- $\alpha$  in der Probe, wird es an die Antikörper gebunden. Daraufhin wird ein zweiter, mit Biotin konjugierter, Antikörper hinzugefügt. Dieser bindet an den

Antikörper-IFN- $\alpha$  Komplex. Zuletzt wird ein Streptavidin-Phycoerythrin-Gemisch hinzugefügt. Dieses emittiert bei Anwesenheit von Biotin ein fluoreszierendes Signal, welches durchflusszytometrisch gemessen werden kann. Im Vergleich zu standardisierten Verdünnungsreihen kann so die Konzentration von IFN- $\alpha$  bestimmt werden kann.

Zur Bestimmung der IFN- $\alpha$  Konzentration wurden ein *fluorescent bead assay* der Firma eBioscience, Frankfurt verwendet (Basic Kit Mouse/Rat Flow Cytomix REF: BMS8440FF und Mouse IFN- $\alpha$  Flow Cytomix REF: BMS86027FF).

### **2.2.9 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

ELISA steht für *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*. Der Test basiert auf der Bindung zweier Antikörper an verschiedene Epitope eines Antigens. Der erste Antikörper ist an den Boden eines Well gebunden. Der zweite Antikörper ist an Biotin gekoppelt. Dieser bindet an das, durch den ersten Antikörper immobilisierte Antigen. So entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Biotin Komplex. Nach einem Waschschrift befinden sich im Well nur noch diese Komplexe. Nun wird eine an Avidin gekoppelte Meerrettichperoxidase hinzugegeben. Das an den zweiten Antikörper gebundene Biotin bindet wiederum an Avidin. Nach einem weiteren Waschschrift wird eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> haltige Detektionslösung hinzugegeben. Das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verbindet sich mit der Meerrettichperoxidase. Dieser Meerrettichperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Komplex oxidiert einen hinzugefügten Farbstoff der dadurch seine Farbintensität ändert. Die Änderung der Farbintensität kann gemessen werden. Sie verhält sich proportional zu dem in der Probe enthaltenen Antigen.

#### **2.2.9.1 Quantifizierung des Proteins Lefty**

Zur Zelllyse wurden  $3 \cdot 10^6$  Zellen mit 50 ml PBS aufgefüllt, zentrifugiert (7 Minuten, 4°C, 500 g) und der Überstand dekantiert. Im Anschluss wurde das Pellet in 220  $\mu$ l einer *protease inhibitor* Lösung (Verhältnis *protease inhibitor* zu PBS: 1:400) aufgenommen. Danach wurden die Proben in Stickstoff schockgefroren, dort für 5 Minuten belassen und anschließend wieder aufgetaut. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Daraufhin wurde die Suspension für 3 Minuten im Ultraschallbad auf Eis behandelt, zentrifugiert (5 Minuten, 4°C, 500 g) und der Überstand dekantiert. Das

Pellet wurde dann in 220 µl PBS aufgenommen. Die Messung der Proteinkonzentration von Lefty erfolgte direkt im Anschluss an die Zelllyse mit dem ELISA Kit for Left/Right Determination Factor 1 (Lefty1) von USCN Life Science Inc. nach Herstellerangaben.

### **2.2.10 RT<sup>2</sup> PCR**

Die *real-time* reverse Transkriptase PCR (RT<sup>2</sup> PCR) ist eine Methode zur Quantifizierung von RNA. In einem ersten Schritt wird mithilfe einer reversen Transkriptase RNA in DNA umgeschrieben. Die entstandene DNA wird dem Verfahren einer gewöhnlichen PCR vervielfältigt. Bei jedem PCR-Zyklus verdoppelt sich im Idealfall die DNA-Menge. Ein mit DNA interkalierender Farbstoff ermöglicht die Quantifizierung von DNA durch Fluoreszenzmessung. Die quantifizierte DNA ermöglicht Rückschlüsse auf die Menge der ursprünglich vorhandenen RNA und damit die Transkriptionsaktivität einzelner Gene der untersuchten Zellen.

#### **2.2.10.1 RNA-Isolation**

Die Isolation der mRNA erfolgte gemäß des Protokolls des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland).

Bei diesem Verfahren werden die Zellproben in Anwesenheit eines Guanidin-Thiocyanat-Puffers zuerst lysiert und homogenisiert. Dieser denaturiert und inaktiviert vorhandene RNasen und gewährleistet so die Aufbereitung von intakter RNA. Im Anschluss wird Ethanol hinzugegeben, um entsprechende Bindungsvoraussetzungen zu schaffen. Die Probe wird danach in eine „RNeasy Mini Spin Column“ gegeben. Dort binden RNA-Fragmente, die größer als 200 Basen sind, an die „RNeasy Silica Membran“. Verunreinigungen binden nicht und werden ausgewaschen.

#### **2.2.10.2 RNA Konzentrationsbestimmung**

Die RNA Konzentrationsmessung erfolgte spektrometrisch. Die Absorption wurde bei 260 nm am NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) gemessen. Hierfür wurde jeweils 1 µl Probe eingesetzt und die RNA-Konzentration durch das Gerät nach folgender Formel berechnet:

$$\text{RNA (ng / } \mu\text{l)} = \text{Absorption}_{260\text{nm}} (\text{absorbance units, AU}) \times \text{Extinktionskoeffizient RNA} \\ (40 \text{ ng} \times \text{cm} \times \mu\text{l}^{-1}) \times \text{Wegstrecke}^{-1} (1 \text{ cm})$$

### 2.2.10.3 cDNA Synthese

Die Synthese der cDNA erfolgte mit „Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads“ (Gelifesciences) nach Angaben des Herstellers. Die eingesetzte RNA-Konzentration betrug 1,5 ng/ $\mu\text{l}$ . Der Kit verwendet die *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MuLV) reverse Transkriptase zur Synthese von *first-strand* cDNA.

Bei der first-strand cDNA Synthese kommt es zur Bindung eines Primers (zur RNA komplementärer DNA-Abschnitt) an RNA. Durch eine Reverse Transkriptase wird aus dem RNA-Primer-Komplex und in Lösung befindlichen Nukleotiden ein zur originalen RNA komplementärer DNA-Strang gebildet.

### 2.2.10.4 cDNA Präamplifikation

Die Präamplifikation der cDNA erfolgte mit dem RT<sup>2</sup> Nano PreAmp cDNA-Synthesis Kit (SABiosciences, Frederick, USA) nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.10.5 Real-Time Polymerasekettenreaktion (Real-Time-PCR)

Die *Real-Time* Polymerasekettenreaktion erfolgte nach Herstellerangaben mit dem TGF $\beta$  / BMP Signaling Pathway PCR Array (PAMM-035Z) von Sabioscience (Frederick, USA). Als Farbstoff wurde SYBR Green® verwendet. SYBR Green® lagert sich an doppelsträngige DNA an. Die Fluoreszenz wird durch die Anlagerung verstärkt, sie steigt somit proportional zur vorhandenen Menge an DNA.

Die Auswertung der Real-Time-PCR Ergebnisse erfolgte mit der RT2 Profiler PRC Array Data Analysis Software, Version 3.5 von Sabioscience. Diese arbeitet mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ohne Effizienzkorrektur. Der relativen Quantifizierung wurde ein *Housekeeping-Gen* Index der Gene *Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*, *Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1* und *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* zugrunde gelegt. Eine Liste der untersuchten Gene findet sich in Tabelle 12 und Tabelle 13.

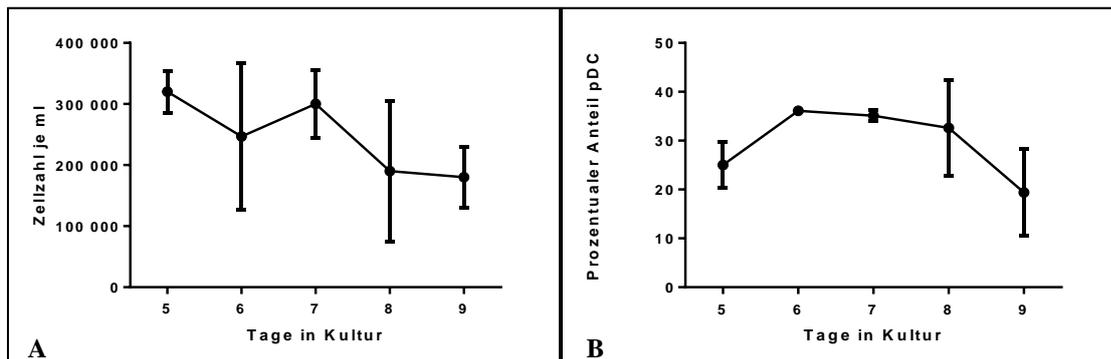
### **2.2.11 Statistik**

Für die statistische Auswertung wurde das Programm Graphpad Prism 6.01 für Windows verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten zweiseitigen T-Test.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Zellexpansion und -analyse

#### 3.1.1 Wachstumskinetik von DC *in vitro*



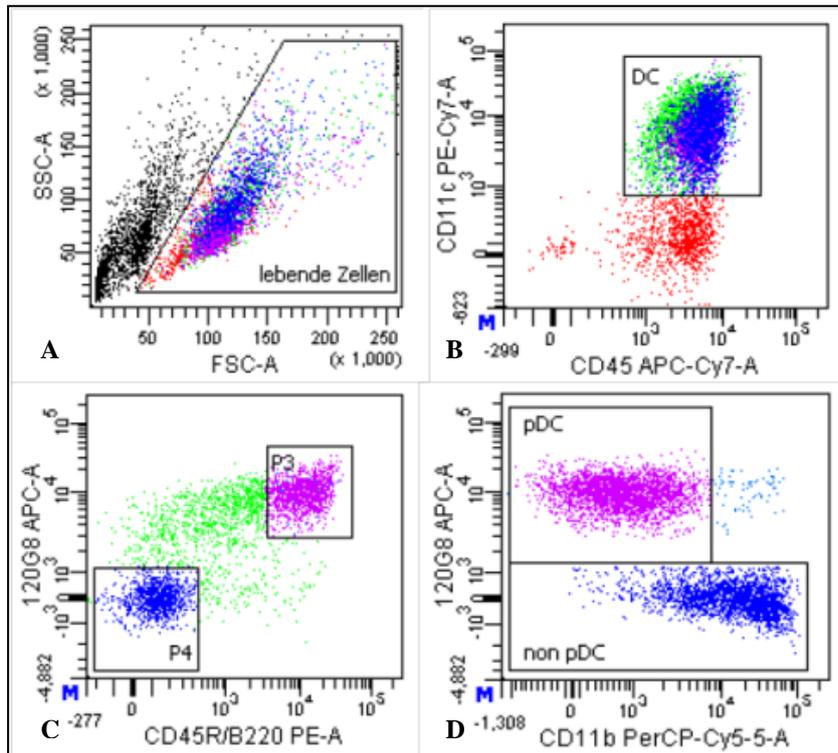
**Abbildung 8: Expansion von Leukozyten und pDC *in vitro***

(A) Anzahl vitaler Leukozyten je ml Kultur. (B) Relativer Anteil pDC (CD11c<sup>+dim</sup>, CD45<sup>+</sup>, 120G8<sup>+</sup>, CD45R/B220<sup>+</sup>, CD11b<sup>neg</sup>). Die Leukozyten wurden aus murinem Knochenmark isoliert und in FLT3 Kultur expandiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD aus drei Experimenten mit zusammen n = 3 Mäusen.

Für die Expressionsanalysen der TGF- $\beta$  Familie in pDC wurde eine Zellkultur etabliert. Dabei wurden die aus dem Knochenmark gewonnenen Leukozyten mit dem FLT-3 Liganden kultiviert. Täglich erfolgte eine Untersuchung der Gesamtzahl an Leukozyten sowie des relativen Anteils an pDC. Es konnte eine Reduktion vitaler Leukozyten bis Tag 6, und ein erneuter Anstieg dieser an Tag 7 beobachtet werden. Ab Tag 8 kam es zu einem weiteren Verlust von Leukozyten.

Der relative Anteil von pDC konnte bis Tag 6 auf ~36 % gesteigert werden und reduzierte sich ab Tag 7 auf ~19 % an Tag 9. Den optimalen Tag zur Zellentnahme für weitere Versuche stellt Tag 7 dar, da Anzahl vitaler Leukozyten und der relative Anteil an pDC hoch sind. In allen Experimenten mit Zellen aus der FLT3 Kultur wurden daher DC von Tag 7 verwendet.

### 3.1.2 Durchflusszytometrische Analyse des Phänotyps *in vitro* generierter DC



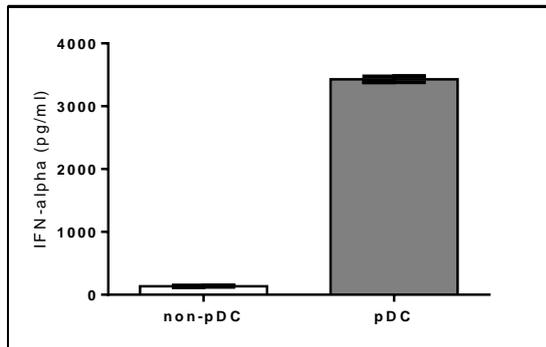
**Abbildung 9: Durchflusszytometrische Analyse des Phänotyps *in vitro* expandierter pDC**

Die Zellen wurden aus murinem Knochenmark isoliert und in FLT3 Kultur expandiert. Der Phänotyp der pDC wurde definiert als  $CD11c^{+/dim}$ ,  $CD45^+$ ,  $120G8^+$ ,  $CD45R/B220^+$ ,  $CD11b^{neg}$  (A) *Gating* der lebenden Zellen im *forward scatter* und *sideward scatter* (ca. 63 %) (B) *Gating* der lebenden Zellen nach dem Expressionsmuster für CD11c und CD45 (DC) (C) *Gating* von DC nach dem Expressionsmuster für 120G8 und CD45R/B220 (D) Weiteres *Gating* der DC nach dem Expressionmuster für CD11b.

Sowohl die Phänoanalyse als auch die Separation von Zellpopulationen der FLT3 *in vitro* Kultur erfolgten durchflusszytometrisch. Die DC ( $CD11c^+$  und  $CD45^+$ ) wiesen einen Anteil von ~85 % der vitalen Leukozyten auf. Der Anteil von pDC ( $CD11c^{+/dim}$   $CD45^+$   $120G8^+$   $CD45R/B220^+$   $CD11b^{neg}$ ) betrug ~31 %. ~25 % der vitalen Leukozyten waren *non-pDC* ( $CD11c^+$   $CD45^+$   $120G8^{neg}$   $CD45R/B220^{neg}$   $CD11b^+$ ).

In durchflusszytometrischen Zellanalysen *postsort* konnte bei pDC eine Reinheit von 99,9 % und bei *non-pDC* eine Reinheit von 99,8 % gemessen werden (nicht dargestellt).

### 3.1.3 Validierung des Phänotyps *in vitro* generierter pDC anhand der Sekretion von IFN- $\alpha$



**Abbildung 10: Zellspezifische IFN- $\alpha$  Produktion *in vitro* expandierter pDC**

IFN- $\alpha$  Konzentrationen bei Überständen von pDC und *non*-pDC (CD11c<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>120G8<sup>neg</sup>CD45R/B220<sup>neg</sup>CD11b<sup>+</sup>). Die *murinen* pDC wurden in FLT3 Kultur *in vitro* expandiert und vor der Stimulation durchflusszytometrisch aufgereinigt. Die Stimulation erfolgte *in vitro* mit ODN2216. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD aus drei Experimenten mit zusammen n = 6 Mäusen (p-Wert < 0,0001).

Um den Phänotyp von pDC anhand typischer Zellfunktionen zu bestätigen, wurde die für pDC zellspezifische Sekretion von IFN- $\alpha$  untersucht.

Nach Stimulation mit ODN2216 war im Überstand von pDC eine IFN- $\alpha$  Konzentration von ~3429 pg/ml messbar. Im Vergleich hierzu ist die gemessene Konzentration von ~135 pg/ml bei *non*-pDC gering. Für die Differenz der Sekretion von IFN- $\alpha$  konnte eine Signifikanz festgestellt werden.

Durch das Experiment konnte eine ausreichende Vitalität *in vitro* expandierter pDC nachgewiesen und deren Phänotyp anhand zelltypischer Eigenschaften bestätigt werden.

### 3.2 Ergebnisse des RT<sup>2</sup>-PCR *Mikroarray*

Zur Identifizierung von Kandidaten für die weitere Forschung, wurde eine globale Genexpressionsanalyse der TGF- $\beta$  Familie durchgeführt. Hierzu wurde in einem semiquantitativen *Mikroarray*, die Transkriptionsaktivität 84 verschiedener Gene der TGF- $\beta$  Familie untersucht, unter anderem von Liganden, Rezeptoren und Regulationsfaktoren. Die Ergebnisse der *in vitro* expandierten DC wurden an DC der Milz *ex vivo* validiert.

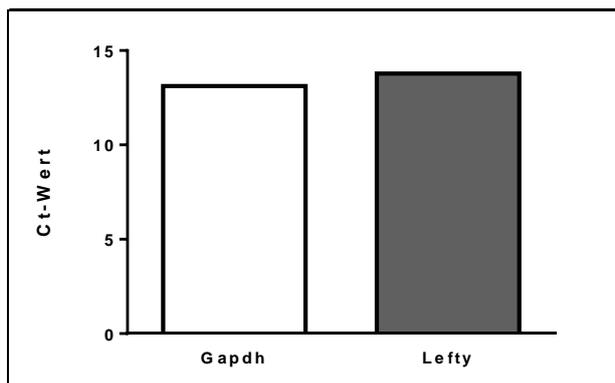
Die höchsten Expressionen von Genen der TGF- $\beta$  Familie in pDC wurden bei Stat1 (*signal transducer and activator of transcription 1*), Lefty (*left-right determinatin factor 1*), Runx1 (*runt related transcription factor 1*), Id2 (*inhibitor of DNA binding 2*) und Acvr2a (*activin receptor IIA*) gemessen.

Aufgrund der unerwartet hohen Transkriptionsrate rückte Lefty, ein aus der Embryonalentwicklung bekanntes Signalmolekül [80] in den Fokus weiterer Experimente.

Die Ergebnisse des *Mikroarray* sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 zusammengefasst.

#### 3.2.1 Lefty-Expression auf Transkriptionsebene

##### 3.2.1.1 Nachweis der Lefty-Expression *in vitro* generierter pDC



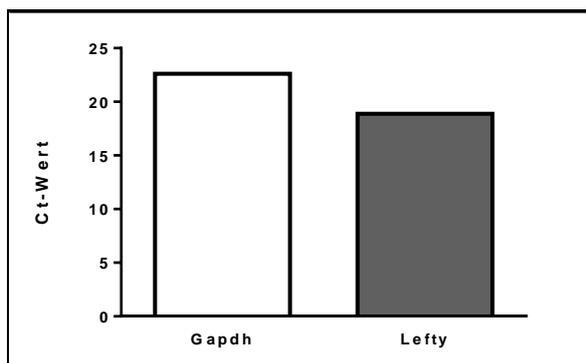
**Abbildung 11: Expression von Lefty in unstimulierten, *in vitro* generierten pDC**

Absoluter CT Wert von Lefty und des konstitutiv exprimierten *Housekeeping*-Gens Gapdh. Die pDC wurden aus murinem Knochenmark isoliert, *in vitro* expandiert und durchflusszytometrisch aufgereinigt. Dargestellt ist der Mittelwert aus n = 11 Mäusen.

Bei unstimulierten, *in vitro* generierten pDC wurde in der RT<sup>2</sup>-PCR eine hohe Expression von Lefty festgestellt. Diese ist bei pDC mit der Expression von *Housekeeping*-Genen vergleichbar. In Abbildung 11 dargestellt ist das *Housekeeping*-Gen Gapdh. Die Expression von Lefty zeigte sich im Vergleich zu anderen Genen der TGF- $\beta$  Familie, wie beispielsweise TGF- $\beta$ 1, erhöht (nicht dargestellt).

Um das Verhalten von pDC unter pathologischen Bedingungen zu untersuchen wurden weitere RT<sup>2</sup>-PCR Experimente mit *in vitro* expandierten pDC nach Stimulation durchgeführt. Stimuliert wurde mit *Klebsiella pneumoniae* Lysat, ODN 2216, und einer Mischung aus PMA und Ionomycin. Alle verwendeten Stimulanzen induzierten eine geringfügig reduzierte Expression von Lefty. Der größte Expressionsrückgang wurde unter Verwendung von PMA und Ionomycin als Stimulans beobachtet (Hier nicht dargestellt, siehe Tabelle 12, Ergebnisse ohne Nachweis einer Signifikanz).

### 3.2.1.2 Nachweis der Lefty-Expression in pDC der Milz *ex vivo*



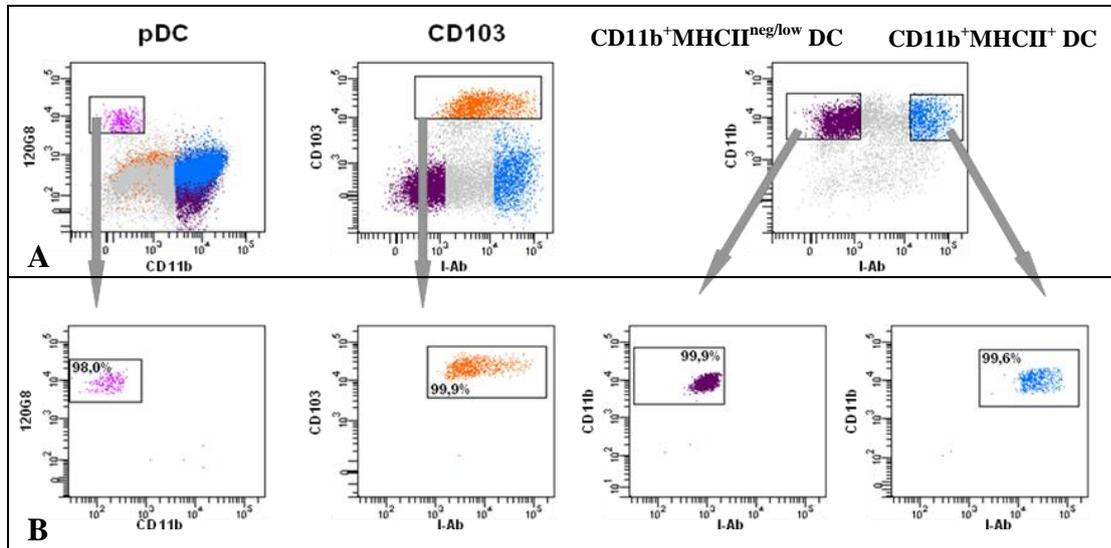
**Abbildung 12: Expression von Lefty in unstimulierten pDC der Milz *ex vivo***

Absoluter CT-Wert von Lefty und des konstitutiv exprimierten *Housekeeping*-Gens Gapdh. Die pDC wurden aus murinen Milzen magnet- und durchflusszytometrisch isoliert. Dargestellt ist der Mittelwert aus n = 10 Mäusen.

Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse *in vitro* expandierter pDC auf *in vivo* generierte pDC übertragbar sein würden, wurde die RT<sup>2</sup>-PCR mit pDC der Milz *ex vivo* wiederholt. Erneut zeigte sich eine hohe Expression von Lefty im Vergleich zu verschiedenen *Housekeeping*-Genen. Hier dargestellt ist das *Housekeeping*-Gen Gapdh. Zudem konnten die Ergebnisse nach Stimulation aus Kapitel 3.2.1.1 bestätigt werden. Wie auch bei *in vitro* expandierten pDC, erwies sich die Expression von Lefty nach *in vitro* Stimulation (*Klebsiella pneumoniae* Lysat) *in vivo* generierter pDC der Milz

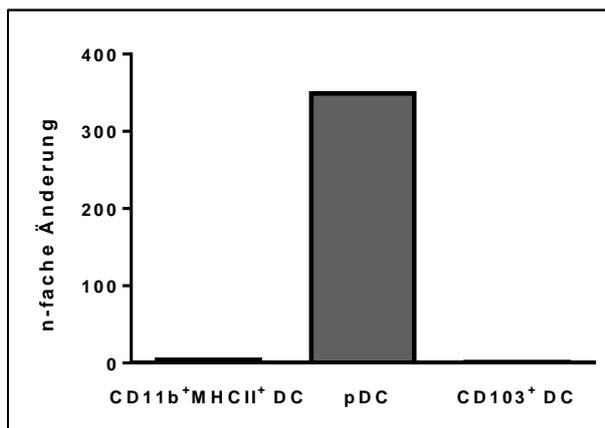
gering herunterreguliert (Hier nicht dargestellt, siehe Tabelle 13, Ergebnisse ohne Nachweis einer Signifikanz).

### 3.2.1.3 Nachweis der Lefty-Expression im *Klebsiella* Pneumonie Modell



**Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse des Phänotyps pulmonaler DC aus Mäusen mit *Klebsiella* Pneumonie**

Die DC wurden aus murinen, mit *Klebsiella pneumoniae* infizierten Lungen isoliert. Respiratorische DC wurden als CD45<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, Siglec-F<sup>neg</sup>, NK1.1<sup>neg</sup> definiert. (A) Gating der DC-Subpopulationen: pDC: 120G8<sup>+</sup>CD11b<sup>neg</sup>, CD103<sup>+</sup> DC: CD103<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>neg/low</sup> DC: CD103<sup>neg</sup>CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>neg/low</sup>, CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> DC: CD103<sup>neg</sup>CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> (B) Reinheitsanalysen der DC postsort.

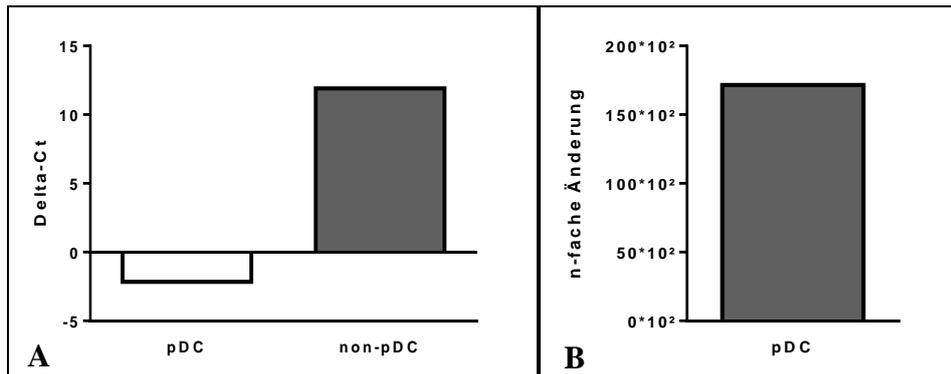


**Abbildung 14: Lefty Expression bei DC aus mit *Klebsiella pneumoniae* infizierten Lungen ex vivo**

n-fache Änderung der Expression von Lefty in CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> DC, pDC und CD103<sup>+</sup> DC zu CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>neg/low</sup> DC. Die DC wurden aus murinen, mit *Klebsiella pneumoniae* infizierten Lungen isoliert (Tag 5 post Infectionem) und durchflusszytometrisch aufgereinigt. Dargestellt ist der Mittelwert aus n = 3 Mäusen.

Von Hackstein et al. wurde eine deutliche Infiltration von pDC in Mäuselungen mit *Klebsiella* Pneumonie festgestellt [78, 99]. Die DC aus infizierten Mäuselungen wurden in dieser Arbeit auf ihr Expressionsmuster für Lefty untersucht. Auch hier konnte eine für pDC spezifische Expression von Lefty demonstriert werden.

### 3.2.1.4 Die Lefty-Expression ist pDC spezifisch

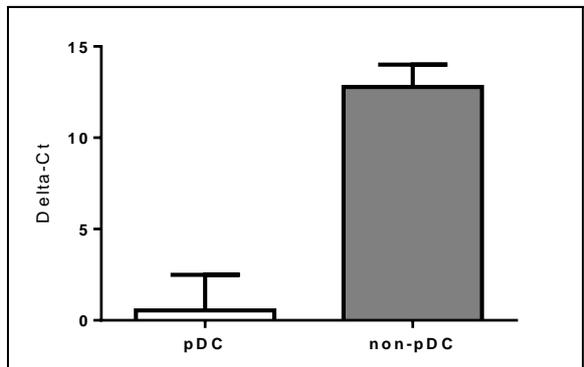


**Abbildung 15: Expression von Lefty bei unstimulierten DC der Milz *ex vivo***

(A) Delta-Ct unstimulierter pDC und non-pDC (CD11c<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>120G8<sup>neg</sup>CD45R/B220<sup>neg</sup>CD11b<sup>+</sup>) unter Verwendung eines *Houskeeping*-Gen Indexes. (B) n-fache Änderung der Lefty-Expression unstimulierter pDC zu non-pDC. Die DC wurden aus *murinen* Milzen isoliert, magnet- und durchflusszytometrisch aufgereinigt. Dargestellt ist der Mittelwert aus n = 11 Mäusen.

Die bisherigen RT<sup>2</sup>-PCR Ergebnisse deuten auf eine erhöhte Expression von Lefty in pDC hin. Es ist im Folgenden zu untersuchen, ob diese Expression für pDC spezifisch ist. Zum Vergleich wurde die Lefty-Expression in non-pDC untersucht. Es konnte ein deutlicher Expressionsunterschied zwischen den beiden DC-Subpopulationen festgestellt werden. Die Expression von Lefty bei pDC ist im Vergleich zur Expression bei non-pDC erhöht. Der Unterschied ist in der n-fachen Änderung eindeutig zu erkennen. Auch bei *in vitro* expandierten DC bestand ein deutlicher Expressionsunterschied (hier nicht dargestellt).

### 3.2.1.4.1 Nachweis einer signifikanten Expressionsdifferenz von Lefty zwischen pDC und non-pDC

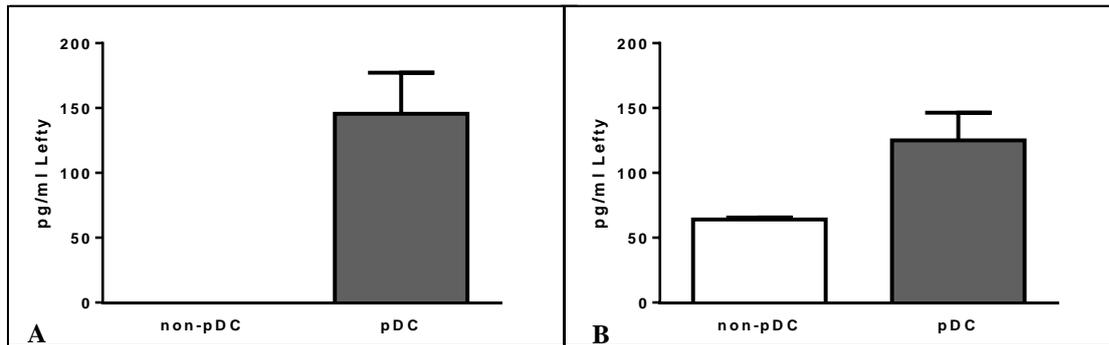


**Abbildung 16: Zusammenfassende Darstellung der Lefty-Expression von pDC und non-pDC**

Die pDC wurden unterschiedlich generiert (*in vitro* expandierte pDC und aus *murinen* Milzen isolierte pDC *ex vivo*) und unterschiedlich vorbehandelt (ODN, *Klebsiella pneumoniae* Lysat, PMA/Ionomycin, unstimuliert). Die non-pDC (CD11c<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>120G8<sup>neg</sup>CD45R/B220<sup>neg</sup>CD11b<sup>+</sup>) wurden aus *murinen* Milzen isoliert, und *ex vivo* unterschiedlich vorbehandelt (unstimuliert und stimuliert mit *Klebsiella pneumoniae* Lysat). Dargestellt ist der Mittelwert ± SD aus sechs Experimenten mit zusammen n = 21 Mäusen bei pDC und zwei Experimenten mit zusammen n = 10 Mäusen bei non-pDC.

Im Vergleich aller untersuchten DC zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Expression von Lefty bei pDC im Vergleich zu non-pDC (p-Wert = 0,0002).

### 3.2.2 Nachweis des Lefty-Proteins in pDC Zelllysate



**Abbildung 17: Proteinkonzentrationen von Lefty in pDC Zelllysate**

(A) Proteinkonzentration in Zelllysaten von pDC und *non-pDC* ( $CD11c^+CD45^+120G8^{neg}CD45R/B220^{neg}CD11b^+$ ). Die DC wurden *in vitro* aus *murinem* Knochenmark mittels FLT3-Ligand expandiert und durchflusszytometrisch aufgereinigt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD aus zwei Experimenten mit  $n = 20$  Mäusen. (B) Proteinkonzentration in Zelllysaten von pDC und *non-pDC*. Die DC wurden aus *murinen* Milzen isoliert und *ex vivo* magnet- und fluoreszenzdurchflusszytometrisch aufgereinigt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD aus zwei Experimenten mit  $n = 25$  Mäusen.

Die Überprüfung der Ergebnisse der RT<sup>2</sup>-PCR erfolgte mittels ELISA. Es gelang der Nachweis des Lefty-Proteins in pDC Zelllysaten. Der Nachweis konnte sowohl bei *in vitro* generierten pDC als auch bei pDC der Milz *ex vivo* erbracht werden. Bei *in vitro* generierten *non-pDC* konnte kein Lefty detektiert werden, die Nachweisgrenze des Tests liegt bei  $\sim 43$ pg/ml. Bei *non-pDC* der Milz wurde eine geringe Menge Lefty detektiert.

## 4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte eine hohe Expression von Lefty bei *murinen* pDC demonstriert werden. Die Expression konnte sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. In den Experimenten kamen unterschiedliche Modelle zur Anwendung. Der Expressionsnachweis gelang bei *in vitro* generierten pDC sowie bei pDC *ex vivo* unter physiologischen und unter pathologischen Bedingungen. Lefty stellt nach Auswertung der bisherigen Versuche einen phänotypischen Marker von pDC dar. Die Expression von Lefty ist relativ spezifisch für pDC und konnte unter allen überprüften Versuchsbedingungen demonstriert werden. Über die Expression von Lefty durch pDC wurde nach unserem besten Wissen bisher noch nicht berichtet.

### 4.1 Erfolgreiche Expansion von pDC *in vitro*

pDC sind selten auftretende Zellen und werden in verschiedenen Geweben vorgefunden [82]. Der Anteil von pDC bei Menschen, wie auch bei der Maus, beträgt circa 0,2-0,8 % der mononukleären Blutzellen [22]. Nur ca. 1 % aller im Knochenmark vorhandenen Zellen sind pDC [28, 82]. In Milz, Tyhmus, Lymphknoten und Blut liegt der Anteil von pDC unter 1 % [82]. Für die experimentelle Forschung mit einem hohen Zellbedarf, ist die reine Isolation aus murinem Gewebe ineffektiv, teuer und ethisch bedenklich.

Gilliet et al. entwickelten 2002 eine Methode, mit der über 40% pDC aus einer murinen Knochenmarkskultur expandiert werden können [28]. Entscheidend für die Expansion von pDC in Kultur ist die Zugabe des Wachstumsfaktors FLT3-Ligand [28].

Die Methode der Zellexpansion von pDC in FLT3-Kultur wurde in dieser Arbeit erfolgreich angewandt und die Ergebnisse konnten orientierend bestätigt beziehungsweise ergänzt werden. Gilliet et al. stellten in ihrer Studie fest, dass sowohl die Zahl vitaler Leukozyten als auch der durchflusszytometrisch ermittelte, prozentuale Anteil pDC zwischen Tag 5 und Tag 10 ansteigt und ab Tag 10 wieder abfällt, mit einer Beschleunigung des Abfalls ab Tag 15 [28]. Die Zellanalysen wurden dabei in fünftägigen Abständen durchgeführt [28]. Zur Ergänzung dieses vorbekannten

Expansionsverhaltens wurde in dieser Arbeit die Zellanalyse zwischen Tag 5 und Tag 9 täglich durchgeführt.

Gilliet et al. ermittelten einen maximalen Anteil von ~92 % CD11c<sup>+</sup> Zellen. Es konnte ein kontinuierlicher Anstieg dieser Zellpopulation bis Tag 20 beschrieben werden, mit niedrigerem Anteil CD11c<sup>+</sup> Zellen vor Tag 10 [28]. Auch in dieser Arbeit war ein sehr hoher relativer Anteil CD11c<sup>+</sup> Zellen (~85%) der vitalen Leukozyten feststellbar. Somit können diese Ergebnisse bis Tag 10 bestätigt werden.

Der maximale Anteil von pDC an den gesamten Leukozyten von ~45 % [28] wurde in dieser Arbeit nicht erreicht. In den durchgeführten Experimenten konnten maximal ~36 % pDC gemessen werden.

Der Tag mit dem maximalen Anteil von pDC an den gesamten Leukozyten stellt in den durchgeführten Experimenten bereits Tag 6 dar. Im Gegensatz zu dieser Arbeit wurden in der Studie von Gilliet et al. die Messungen in fünftägigen Abständen durchgeführt, der höchste Anteil pDC wurde dabei an Tag 10 gemessen. Der Effekt des früheren Anstieges könnte auf die tägliche Überprüfung der Leukozytenpopulationen zurückzuführen sein. [28].

## 4.2 Exakte Phänotypisierung dendritischer Subpopulationen

Die Zellsortierung *in vitro* generierter DC und von DC der Lunge erfolgte fluoreszenzzytometrisch. Zur Sortierung von DC aus Milzen wurde die Fluoreszenzzytometrie durch eine vorherige magnetische Zellseparation ergänzt. Hierbei handelt es sich um gängige Methoden bei der Charakterisierung dendritischer Zellpopulationen [28, 82, 78, 83]

Respiratorische Leukozyten aus Lungen mit *Klebsiella* Pneumonie wurden anhand der Expression von CD45 selektiert. Aus den CD45<sup>+</sup> Zellen wurden DC als CD11c<sup>+</sup>, Siglec-F<sup>neg</sup>, NK1.1<sup>neg</sup> definiert um autofluoreszierende Makrophagen und natürliche Killerzellen auszuschließen [78]. PDC wurden als CD11c<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, 120G8<sup>+</sup>, Siglec-F<sup>neg</sup>, NK1.1<sup>neg</sup>, CD11b<sup>neg</sup> identifiziert.

PDC aus Milzen und aus der *in vitro* Kultur wurden als CD11c<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, 120G8<sup>+</sup>, CD45R/B220<sup>+</sup>, CD11b<sup>neg/dim</sup> definiert. Bei der magnetischen Sortierung der Zellsuspensionen *muriner* Milzen, wurde mit CD11c und mPDCA-1 Antikörpern vorselektioniert.

MPDCA-1 und 120G8 binden an dasselbe Antigen *bone marrow stromal cell Ag 2* (BST2) und die Bindung ist unter physiologischen Bedingungen für murine pDC spezifisch [84, 82]. Auch eine Abgrenzung zu den *interferon-producing killer dendritic cells* (IKDC) ist durch 120G8 gegeben [85]. Die durch 120G8 markierten pDC unterscheiden sich nicht von B220<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Gr1<sup>low</sup>CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>low</sup> pDC, einer gängigen phänotypischen Definition von pDC [82]. Die Gruppe um Blasius et al. postulierte jedoch, dass 120G8 nur im physiologischen Zustand spezifisch an pDC bindet [84]. Bei Maus-Modellen mit Entzündungen könnten beispielsweise Plasmazellen nicht alleine durch 120G8 differenziert werden. Auch bei anderen Zelltypen könnte die Differenzierung schwer fallen [84, 82]. In der durchflusszytometrischen Analyse dieser Arbeit konnte durch die Kombination der verwendeten Antikörper jedoch eine klare Abgrenzung von 120G8<sup>+</sup> pDC aus *murinen* Lungen mit *Klebsiella* Pneumonie getroffen werden.

Als Kontrollgruppe wurde bei einigen Versuchen der Begriff *non-pDC* verwendet. Dieser Begriff wurde gewählt, weil der durchflusszytometrisch bestimmte Phänotyp (CD11c<sup>+</sup>,CD45<sup>+</sup>,120G8<sup>neg</sup>,CD45R/B220<sup>neg</sup>,CD11b<sup>+</sup>) für die Beschreibung einer einzelnen Subpopulation der cDC nicht präzise genug ist. Eine genaue Abgrenzung wurde nicht vorgenommen, vielmehr sollte die Gruppe der *non-pDC* nur das Vorhandensein von pDC ausschließen. In der fluoreszenzzytometrischen Definition der *non-pDC* sind folgende cDC Subpopulationen vereint: Die CD11b<sup>+</sup> cDC des lymphatischen Gewebes, die CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> cDC des nichtlymphatischen Gewebes, die CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> cDC des nichtlymphatischen Gewebes sowie Langerhanszellen [6, 82]. Weiter ist zu beachten, dass der Oberflächenmarker CD11c bei unterschiedlicher Zellaktivierung nicht stabil exprimiert, sondern nach Aktivierung oder Migration durch cDC herunterreguliert wird [6]. Somit können aktivierte cDC zusätzlich ausgeschlossen werden.

Eine alleinige Unterscheidung und Definition der DC-Subkulturen anhand der Oberflächenmerkmale ist jedoch nicht ausreichend, weshalb weitere zelltypische Eigenschaften zu untersuchen sind [86, 6]. Gilliet et al. beschrieben, dass in FLT3-Kultur expandierte pDC von *in vivo* generierten pDC morphologisch nicht zu differenzieren sind [28]. Der plasmazytoide Phänotyp konnte auch in dieser Arbeit orientierend bestätigt werden (siehe Abbildung 7). Das Hauptmerkmal von pDC ist jedoch die Sekretion großer Mengen an IFN- $\alpha$  nach Stimulation [20]. Gilliet et al.

konnten diese zellspezifische Eigenschaft auch bei aus der FLT3-Expansionskultur isolierten pDC nachweisen [28]. Die Sekretion großer Mengen von IFN- $\alpha$  durch pDC aus FLT3-Expansionskultur konnte in den Versuchen dieser Arbeit bestätigt werden. Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit eine klare Unterscheidung der unterschiedlichen dendritischen Subpopulationen getroffen werden. Weiterhin deuten die durchgeführten Experimente der Durchflusszytometrie, Mikroskopie und die quantitativen Proteinassays auf eine Gleichartigkeit von Oberflächenmerkmalen und Funktionalität *in vitro* expandierter und *in vivo* generierten pDC hin und bestätigen damit die Arbeit von Gilliet et. al [28].

### 4.3 Expression von Lefty durch pDC

Eine globale Genexpressionsanalyse der TGF- $\beta$  Superfamilie bei pDC bot die Möglichkeit, Hinweise auf die zellspezifische Expression einzelner Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Signaltransduktoren zu erhalten. Hierbei konnte eine hohe Lefty-Expression als Merkmal von pDC unter verschiedenen Konditionen demonstriert werden. Dies wurde zuerst bei unstimulierten, *in vitro* generierten pDC festgestellt. Da die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Modellen mit *in vitro* Kulturen begrenzt ist, wurde das Experiment mit pDC aus *murinen* Milzen wiederholt. Die vorherigen Ergebnisse konnten hierbei bestätigt werden. Die Lefty-Expression von pDC zeigte sich vergleichbar stark erhöht.

pDC durchlaufen nach Aktivierung phänotypische sowie funktionelle Veränderungen [30, 22], weshalb die Lefty-Expression auch unter pathologischen Bedingungen untersucht wurde. Als Stimuli zur Aktivierung gelten unter anderem Viren oder bakterielle DNA, welche durch CpG-ODN imitiert werden kann [26, 30, 22]. Zunächst wurde die Lefty-Expression bei *in vitro* generierten pDC nach Stimulation mit *Klebsiella pneumoniae* Lysaten untersucht. Die Expression zeigte sich bei den stimulierten pDC im Vergleich zu unstimulierten pDC gering herunterreguliert. Die Ergebnisse wurden an pDC der Milz nach *in vitro* Stimulation überprüft und konnten bestätigt werden. Weiter wurde die Lefty-Expression bei *in vitro* expandierten pDC nach Stimulation mit PMA/Ionomycin und ODN gemessen. Die Expression war nach Stimulation mit allen getesteten Stimulanzen herunterreguliert. Die Herunterregulation könnte durch eine reduzierte Lefty-Expression aktivierter pDC bedingt sein. Jedoch besteht bei pDC auch eine hohe phänotypische Plastizität. pDC können zu cDC

ähnlichen DC (*pDC-derived DC*) weiter differenzieren [30, 22, 31]. Die Resultate könnten auch hierdurch beeinflusst sein.

Es kann bei *in vitro* Experimenten natürlich kein Anspruch auf vollständige Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das Immunsystems lebender Tiere erhoben werden. Zusätzlich bestehen geringfügige Unterschiede zwischen pDC aus mit FLT3 behandelten und unbehandelten Mäusen [87]. Um die Ergebnisse an einem möglichst realitätsnahen Modell zu validieren, wurden pDC aus mit *Klebsiella pneumoniae* infizierten *murinen* Lungen untersucht. Die hohe Expression von Lefty konnte auch in diesem Experiment bestätigt werden.

In weiteren Versuchen wurde die Expression von Lefty auf Proteinebene untersucht. Die Proteinexpression unterliegt im Allgemeinen dynamischen Prozessen und kann durch unterschiedliche Parameter beeinflusst werden. Der Gleichgewichtszustand zellulärer Proteinmengen wird post-transkriptional, translational und durch Proteindegeneration erreicht [88]. Es wird eine wichtige Rolle regulatorischer Prozesse nach der Translation angenommen. Eine strikte Korrelation zwischen der Menge an RNA und der dazugehörigen Proteinmenge besteht nicht [88].

Zum qualitativen und quantitativen Nachweis des Proteins Lefty wurde ein für Lefty spezifischer ELISA ausgewertet. Hier wurde Lefty bei *in vitro* expandierten pDC detektiert. Der Lefty-Nachweis konnte bei pDC der Milz *ex vivo* bestätigt werden. Somit konnte die Expression auf Transkriptions- sowie auf Proteinebene dargestellt werden. Eine Unterscheidung zwischen pDC aus FLT3 Kultur und pDC *ex vivo* kann anhand der Lefty-Expression nicht vorgenommen werden.

#### **4.4 Die Lefty-Expression ist relativ pDC spezifisch**

CDC unterscheiden sich von pDC in Entstehung, Lebenszyklus, Funktion und Phänotyp [22, 15, 12]. In dieser Arbeit wurde der Fokus auf Expressionsunterschiede von Lefty gelegt. Es konnte demonstriert werden, dass Lefty bei *non-pDC* im Vergleich zu pDC herunterreguliert ist. Dies konnte initial bei *in vitro* generierten *non-pDC* auf Transkriptionsebene demonstriert und in weiteren Experimenten mit pDC der Milz *ex vivo* verifiziert werden. Um die Ergebnisse an einem möglichst realitätsnahen Modell zu validieren, wurden erneut pDC aus *murinen* Lungen mit *Klebsiella* Pneumonie untersucht. Es konnte demonstriert werden, dass die hohe Expression von Lefty auch im

Vergleich zu weiteren DC-Subpopulationen der Lunge (CD103<sup>+</sup> DC; CD11b<sup>+</sup> MHCII<sup>neg/low</sup> DC; CD11b<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> DC) pDC spezifisch ist.

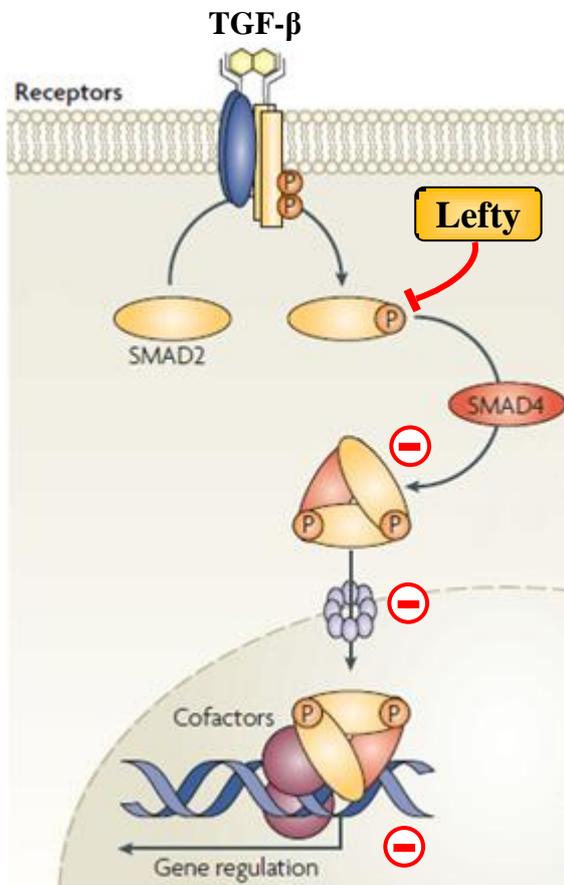
Bei *in vitro* generierten *non*-pDC wurde in einem Lefty-spezifischen ELISA, im Gegensatz zu pDC, kein Lefty-Protein detektiert. Die Messung einer geringen Lefty-Protein-Expression bei *non*-pDC der Milz *ex vivo* ist möglicherweise auf Verunreinigungen der *non*-pDC Subpopulation mit pDC zurückzuführen. Dies ist anzunehmen, da aufgrund der geringen Zellzahlen bei pDC aus *murinen* Milzen eine weniger strikte durchflusszytometrische Sortierung angewandt wurde.

#### 4.5 Lefty antagonisiert den TGF- $\beta$ Signalweg

TGF- $\beta$  ist ein Zytokin mit vielfältigen Funktionen in unterschiedlichen Geweben und zu verschiedenen Zeitpunkten zellulärer Zyklen. Als ein solch wichtiges Zytokin unterliegt es diversen positiven als auch negativen Regulationsmechanismen [66]. Als einen Inhibitor des TGF- $\beta$  Signalweges konnte Lefty identifiziert werden [89, 90]. Die Wirkung von TGF- $\beta$ 1 wird durch Lefty dosisabhängig herunterreguliert [89]. Die Blockade des TGF- $\beta$  Signalweges durch Lefty findet über eine Hemmung der Phosphorylierung des R-SMAD SMAD2 statt [89]. Die Inhibierung der Signalkaskade erfolgt vermutlich der Rezeptoraktivierung nachgelagert [89]. Die Inhibierung von SMAD2 wurde bei P19 Zellen mit einem konstitutiv aktivem TGF- $\beta$  Rezeptor demonstriert [89]. Übereinstimmend beobachteten Kim et al. bei aus Lefty-*Knockout*-Mäusen gewonnenen Stammzellen eine gesteigerte Phosphorylierung von SMAD2 [91]. Durch die Blockade der SMAD2 Phosphorylierung werden die in der Signalkaskade nachgelagerten Prozesse inhibiert. Reduziert werden die Heterodimerisation von SMAD2 mit SMAD4, die Translokation des SMAD2-SMAD4 Komplexes in den Zellkern und die Akkumulation des Komplexes im Nukleus [89]. Daraus folgt eine Unterdrückung der TGF- $\beta$  induzierten Genexpression [89].

Ulloa et al. stellten außerdem fest, dass sowohl das 42-kDa Vorläuferprotein als auch die 28 kDa Form von Lefty die Aktivität der MAPK steigert [89]. Die aktivierte MAPK phosphoryliert R-SMAD Proteine in der Verbindungsregion zwischen der DNA-bindenden Domäne und der transkriptionsaktivierenden Domäne [92]. Diese Phosphorylierung führt zu einer Inhibierung der durch TGF- $\beta$ 1 induzierten Anreicherung von SMAD2 im Nukleus sowie der SMAD abhängigen Transkription [92, 89]. Aufgrund dessen wird angenommen, dass auch die durch Lefty verursachte

Aktivierung des MAPK Signalweges einen regulierenden Einfluss auf das TGF- $\beta$ 1 Signal hat [89].



**Abbildung 18: Lefty hemmt die TGF- $\beta$ 1 Signaltransduktion**

Lefty hemmt die Phosphorylierung von SMAD2. Durch die Blockade der SMAD2 Phosphorylierung werden die in der Signalkaskade nachgelagerten Prozesse inhibiert. Reduziert werden die Heterodimerisierung von SMAD2 mit SMAD4, die Translokation des SMAD-Komplexes in den Zellkern und die Akkumulation des Komplexes im Nucleus. Daraus folgt die Repression der TGF- $\beta$ 1 induzierten Genexpression [89]. Graphik modifiziert nach Schmierer et al. [56]. Übernahme mit Genehmigung von RightsLink®.

#### 4.5.1 Mögliche intrazelluläre Bedeutung

PDC entstehen wie auch cDC aus multipotenten CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks („multipotent progenitor“, MPP) [25]. Diese differenzieren unter anderem weiter zu „common DC progenitors“, CDP, aus denen sowohl cDC als auch pDC hervorgehen können [93]. Der FLT3-Ligand ist das hauptsächlich an der Differenzierung zu pDC beteiligte Zytokin [11]. Zusätzlich wird die Differenzierung der Vorläuferzellen zu DC noch durch weitere Zytokine beeinflusst, unter anderem TGF- $\beta$ 1 [9, 94, 95].

TGF- $\beta$ 1 fördert bei MPP die Differenzierung zu „common DC progenitors“ CDP durch die Hochregulation DC zugehöriger Genexpression, wie beispielsweise des FLT3-Rezeptors [95]. Bei CDP wird die Differenzierung zu DC durch TGF- $\beta$ 1 beschleunigt [94]. Darüber hinaus beeinflusst TGF- $\beta$ 1 die Differenzierung von CDP in

unterschiedliche DC Subpopulationen. TGF- $\beta$ 1 fördert die Differenzierung von Vorläuferzellen zu cDC, entgegengesetzt hierzu wird die Differenzierung zu pDC reduziert [94].

Dies findet über die Regulation Subspezies-spezifischer Genexpression statt [94]. In Genanalysen wurde demonstriert, dass TGF- $\beta$ 1 bei Vorläuferzellen die Expression von wichtigen Genen der cDC Entwicklung wie beispielsweise den *IFN-regulatory factor-4* oder *RelB* sowie einiger Mitglieder der NF- $\kappa$ B Familie induziert [94]. Auch wurde die Expression von Genen, die für wichtige cDC Funktionen benötigt werden, gesteigert. Hierzu zählen Gene von kostimulatorischen Molekülen, MHC-II Gene und weitere Gene, die für die Antigenverarbeitung und -präsentation benötigt werden [94].

Zudem wurde eine gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktor *Inhibitor of differentiation/DNA binding 2* beobachtet. Dieser Transkriptionsfaktor hemmt die Differenzierung von Vorläuferzellen zu pDC [94].

Zusammenfassend steigert TGF- $\beta$ 1 somit die cDC spezifische Genexpression und verhindert die Entwicklung von pDC aus Vorläuferzellen [94].

Die hohe Expression des TGF- $\beta$  Antagonisten Lefty durch pDC könnte in diesem Kontext als intrazelluläre negative Regulation der TGF- $\beta$ 1 Signaltransduktion fungieren.

Möglich ist, dass dies bereits bei CDP mit Polarisierung zur pDC-Differenzierung eine wichtige Rolle spielt. Lefty könnte hier als intrazellulärer Schutzmechanismus gegen das TGF- $\beta$ 1 Signal fungieren und somit die Differenzierung zu pDC gewährleisten. Bei reifen pDC könnte Lefty die Expression von Genen, die für die Ausbildung der cDC typischen Funktionen benötigt werden, hemmen und auf diesem Weg die Weiterdifferenzierung zu *pDC-derived DC* unterdrücken.

#### **4.5.2 Mögliche parakrine Bedeutung**

Gewebsstroma enthält Fibroblasten, die extrazelluläre Matrix und Kollagen auf- und abbauen. Die Homöostase der Matrix wird durch Wachstumsfaktoren und Zytokine präzise koordiniert. Diese steuern sowohl die Sekretion und Aktivierung von Proteinen der extrazellulären Matrix als auch deren enzymatischen Abbau [69]. Die TGF- $\beta$  Zytokine nehmen eine zentrale Rolle bei der Regulation unterschiedlicher Zellfunktionen ein, unter anderem im Bereich der Wundheilung [47, 89]. TGF- $\beta$ 1 und -2 besitzen pro-fibrotische Eigenschaften. Sie erhöhen die Kollagensynthese und

vermindern den Abbau der extrazellulären Matrix. TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 werden in Fibroblasten pathologischer Wundheilung im Vergleich zu normalen Fibroblasten überschießend produziert [73, 96]. Die Überexpression von TGF- $\beta$ 1 und -2 führt zu Gewebsfibrose und Narbenbildung [90, 74, 52, 51]. Das profibrotische Potential von TGF- $\beta$ 1 ist mitverantwortlich für die Sklerosierung von Leber, Lunge, Nieren, Haut und weiteren Geweben [66]. Im Gegensatz dazu werden TGF- $\beta$ 3 antifibrotische Eigenschaften zugeschrieben [73, 75].

Mason et al. zeigten 2002, dass Fibroblastenzellen, die nach retroviraler Transduktion Lefty exprimieren, die Fähigkeit zur Kollagenablagerung verlieren [69]. Zudem waren bei diesen dauerhaft die Level des Bindegewebs-Wachstumsfaktors und Kollagen Typ I herunterreguliert [69]. Die Kollagenolyse, die Gelatinolyse, die Elastolyse und die caseinolytische Aktivität nahmen hingegen bei den transduzierten Fibroblasten zu [69]. Interessanterweise konnte auch in Versuche von Li et al. gezeigt werden, dass in fetaler Haut mehr Lefty-positive Zellen zu finden sind als in adulter Haut. Am wenigsten Lefty-positive Zellen konnten in hypertrophen Wunden nachgewiesen werden [97]. Dies ist bemerkenswert, da adulte Wunden durch Narbengewebe ersetzt werden, embryonale Wunden hingegen narbenfrei verheilen [72].

Im Überblick führt Lefty damit zu Umbauvorgängen mit signifikanter Verringerung von extrazellulärer Matrix im Stroma. Die Blockade des TGF- $\beta$  Signals wird bei etablierten antifibrotischen Therapieregimen zum Beispiel mit Tamoxifen bereits ausgenutzt [96]. Lefty als Antagonist von TGF- $\beta$  stellt hier einen neuen Ansatz dar. Dieses könnte von pDC in Wundgebieten freigesetzt werden. Gregorio et al. stellten 2010 fest, dass es nach mechanisch zugefügten Hautverletzungen zu einer raschen Infiltration von pDC in die Wunde kommt [35]. Die Infiltration durch pDC hält nur kurzfristig an. Die höchsten Konzentrationen von pDC im Wundengewebe wurde nach 24 Stunden erreicht, nach 48 Stunden wurden keine erhöhten pDC Zellzahlen in der Haut mehr festgestellt [35]. Die pDC wurden von körpereigenen Nukleinsäuren durch einen TLR7 und einen TLR9 abhängigen Mechanismus aktiviert und produzierten IFN- $\alpha$  [35]. Die Einwanderung von pDC hat einen bedeutenden Einfluss auf die Wundheilung. So führte die Depletion von pDC zu einer Reduktion der akuten Inflammation und zu einer verlängerten Reepithelisierungszeit [35].

Die Sekretion des TGF- $\beta$  Antagonisten Lefty durch pDC könnte wichtige Impulse für den weiteren Verlauf der Wundheilung geben. Durch Hemmung des TGF- $\beta$ 1 und - $\beta$ 2

Signalweges könnte Lefty einen den antifibrotischen Einfluss im Wundgebieten ausüben und auf diesem Weg Fibrosierung und Narbenbildung reduzieren.

#### 4.6 Limitation der Studie

In der vorliegenden Arbeit wurde in Teilen Experimente an *in vitro* expandierten oder *ex vivo* stimulierten DC durchgeführt. Dies erlaubte die Untersuchung größerer Zellzahlen der ansonsten sehr seltenen pDC und minimierte die benötigten Tierversuche. Trotz phänotypischer und funktioneller Ähnlichkeit dieser Zellen mit pDC *in vivo* kann kein Anspruch auf eine vollständige Übertragbarkeit von zellulären Vorgängen auf die Situation im lebenden Organismus erhoben werden. Um dem Sorge zu tragen, wurden weitere Versuche mit aus *murinen* Milzen isolierten DC sowie mit DC aus mit *Klebsiella pneumoniae* infizierten Mäuselungen durchgeführt, welche die zuvor durchgeführten Experimente bestätigten.

Eine weitere Limitation stellt die geringe statistische Basis dar. Aufgrund der Seltenheit von pDC, des explorativen Charakters der Arbeit und den sich daraus ergebenden möglichen Experimenten, konnte keine fundierte statistische Analyse erfolgen.

In allen durchgeführten Versuchen wurden DC aus mehreren Mäusen zusammengeschlossen, wodurch verfälschte Ergebnisse bedingt durch individuelle Eigenschaften einzelner Mäuse ausgeschlossen werden können. Dennoch bildet jedes einzelne Ergebnis der RT<sup>2</sup>-PCR jeweils nur einen unabhängigen Versuch ab. Diese Schwäche kann dadurch relativiert werden, dass die RT<sup>2</sup>-PCR an unterschiedlich generierten und vorbehandelten DC durchgeführt wurde. Hierbei konnte zusammenfassend eine konsistent hohe und pDC-spezifische Lefty-Expression demonstriert werden.

Ein erhöhter Stichprobenumfang an Versuchstieren und eine damit einhergehende höhere Anzahl an Versuchen hätte die Ergebnisse auf eine sicherere statistische Basis stellen können. Der große Aufwand, die finanzielle Belastung von Tierzucht und Zellentnahme sowie ethische Bedenken ließen jedoch keine höhere Anzahl an Versuchen zu.

Zudem sollte der Nachweis von Lefty mit der Durchführung eines Westernblot und der Sequenzierung des Lefty-Proteins auf eine sicherere Basis gestellt werden. Die Spezifität der PCR und des ELISA gelten zwar als sehr hoch, jedoch ist es natürlich unmöglich sämtliche Kreuzreaktionen zwischen Lefty und ähnlich aufgebauten

Molekülen auszuschließen. Durch Kombination beider Methoden konnte die Möglichkeit falsch positiver Testergebnisse dennoch begrenzt werden.

#### 4.7 Ausblick

Ein tieferes Verständnis von Entwicklung und Funktionsweise von pDC könnte neue Therapieansätze in unterschiedlichen Gebieten der Medizin ermöglichen [22]. Die Differenzierung zu pDC und das komplexe Zusammenspiel mit weiteren Abwehrzellen stellt ein weites Gebiet zukünftiger Forschung dar. Lefty könnte hier eine wichtige Rolle einnehmen, indem es in Richtung pDC polarisierte Vorläuferzellen vor TGF- $\beta$  Signalen schützt. Hier könnten FLT3 Zellkulturen unter Zugabe von Lefty weitere Hinweise liefern. Ebenso könnte mit induzierbaren *Lefty-Knockout*-Mäusen die Relevanz der Lefty-Expression überprüft werden.

Die Erforschung des komplexen Zusammenspiels zwischen Bindegewebszellen und Wachstumsfaktoren könnte langfristig auch zu einem tieferen Verständnis fibrotischer Umbauvorgänge führen und damit möglicherweise das Therapiespektrum erweitern.

Die hohe Expression von Lefty in pDC und deren Einwanderung in Hautwunden könnten hier einen möglichen Ansatzpunkt darstellen. Daher sollte untersucht werden, ob Lefty in quantitativ relevanten Größenordnungen sezerniert wird. Die Sekretion würde den Verdacht der parakrinen Bedeutung des Wachstumsfaktors Lefty in der Wundheilung erhärten. Ob die Sekretion durch Stimuli unterdrückt oder verstärkt werden kann, wäre in weiteren Schritten zu überprüfen.

Mit Wundassays und durch den Einsatz von rekombinanten Lefty könnte der Einfluss auf die Fibrosierung und die Reepithelialisierung von Lefty pDC-unabhängig getestet werden.

Wie von Hackstein et al. [78] gezeigt wurde, wandern pDC in der postakuten Phase der Pneumonie auch in die Lunge ein. Ob diese dort einen Einfluss auf die Entwicklung postpneumonischer Lungenfibrose oder bei der Fibrosierung anderer Gewebe ausüben, stellt einen weiteren interessanten Forschungsansatz dar.

Lefty antagonisiert zudem noch weitere Signalmoleküle der TGF- $\beta$  Superfamilie wie beispielsweise Nodal und Vg-1 [98]. Ob diesen weiteren Signalmodifikationen eine wichtige Bedeutung zukommt könnte weiter erforscht werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

**Hintergrund:** pDC sezernieren nach Kontakt mit Viren große Mengen von IFN- $\alpha$ . Weitere Funktionen sind aktuell Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Die Zytokine der TGF- $\beta$  Superfamilie haben entscheidenden Einfluss auf die Zellproliferation, -migration und -differenzierung hämatopoetischer Stammzellen, DC und weiterer Zellarten. TGF- $\beta$ 1 hemmt die Differenzierung von Vorläuferzellen zu pDC und fördert die Differenzierung zu unreifen *cDC*. In der Wundheilung werden TGF- $\beta$ 1 profibrotische Eigenschaften zugesprochen.

Zielsetzung der Dissertation war die Erstellung eines Transkriptions- und Expressionsmusters von Genen der TGF- $\beta$  Superfamilie in *murinen* pDC.

**Methoden:** Zum Erhalt hoher Zellzahlen der seltenen *murinen* pDC wurde eine *in vitro* Kultur etabliert. Die DC wurden durchflusszytometrisch sortiert und die phänotypische IFN- $\alpha$  Produktion von pDC mit einem *Fluorescent Bead Assay* bestätigt. Bei den *in vitro* expandierten pDC wurde mit einem semiquantitativen PCR-*Mikroarray* ein Genexpressionsprofil der TGF- $\beta$  Superfamilie erhoben. Hierbei gewonnene Ergebnisse wurden an *in vitro* expandierten pDC unter verschiedenen Versuchsbedingungen sowie an pDC *ex vivo* überprüft und mit der Expression weiterer DC-Subpopulationen verglichen. Selektiv wurde ein ELISA zur Erfassung der Proteinexpression des TGF- $\beta$  Signalmoleküls Lefty durchgeführt.

**Ergebnisse:** Von den Genen der TGF- $\beta$  Superfamilie in pDC waren Stat1 und Lefty am höchsten exprimiert. Lefty, ein aus der Embryonalentwicklung bekanntes Signalmolekül, rückte in den Fokus weiterer Experimente. Es gelang der Nachweis hoher Lefty-Expression auf Transkriptionsebene unter verschiedenen pathogenen Bedingungen sowie bei pDC der Milz und der Lunge *ex vivo*. Die Expression von Lefty auf Proteinebene konnte demonstriert werden. Im Vergleich zu weiteren DC Subpopulationen war die Expression von Lefty für pDC relativ spezifisch.

**Schlussfolgerungen:** Die Arbeit zeigt erstmals die hohe Expression von Lefty durch pDC. Lefty antagonisiert bekanntermaßen den TGF- $\beta$  Signalweg. Hierdurch könnte Lefty die Differenzierung von Vorläuferzellen zu pDC, deren weitere Proliferation und Funktion beeinflussen. Nach Sekretion wäre ein antifibrotischer Einfluss in der Wundheilung denkbar.

## 6 SUMMARY

**Background:** Upon contact with viruses pDC secrete large amounts of INF- $\alpha$ . Further capacities are at present object of scientific investigations. The cytokines of the TGF- $\beta$  superfamily are crucial in cellular proliferation, -migration and differentiation of haematopoietic stem cells, DC and others. TGF- $\beta$ 1 suppresses the differentiation of precursor cells into pDC and supports the differentiation to immature cDC. In wound healing TGF- $\beta$ 1 is supposed to have fibrogenic properties.

This dissertation was aimed to establish a pattern of transcription and expression of genes of the TGF- $\beta$  superfamily in *murine* pDC.

**Methods:** To obtain high amounts of the rare *murine* pDC an *in vitro* culture was established. DC were sorted by flow cytometry and the phenotypical production of IFN- $\alpha$  by pDC was proven with a fluorescent bead assay. With a semiquantitative PCR microarray the genetic profile of the TGF- $\beta$  superfamily in *in vitro* expanded pDC was raised. The hereby gained results were validated in *in vitro* expanded pDC under various conditions as well as in pDC *ex vivo*. The results were further compared with the expression by other DC subpopulations. Selectively an ELISA was realized to demonstrate the protein expression of the signaling molecule Lefty.

**Results:** From the genes of the TGF- $\beta$  superfamily Stat1 and Lefty were the highest expressed by pDC. Further investigations were focused on Lefty, a signaling molecule known for its role in embryogenesis. The high expression of Lefty on level of transcription was proven under various pathogenetic conditions as well as in pDC of spleen and lung *ex vivo*. It was possible to demonstrate the expression of Lefty as a protein. In comparison with other DC subpopulations the expression of Lefty was relative specific for pDC.

**Conclusions:** This work was able to demonstrate the high expression of Lefty by pDC for the first time. Lefty is a known antagonist of the TGF- $\beta$  signaling pathway. Hereby Lefty could influence differentiation of precursor cells into pDC, further proliferation and properties. Upon secretion an anti-fibrogenic influence in wound healing would be possible.

# 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
Acvr2a	<i>activin receptor IIA</i>
AMH	Anti-Müller Hormon
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BMP	Bone morphogenic protein
BST2	<i>bone marrow stromal cell Ag 2</i>
CD	Unterscheidungsgruppen „ <i>Cluster of Differentiation</i> “
CD62L	L-Selektin
cDC	konventionelle Dendritische Zelle
cDNA	komplementäre DNA
CDP	<i>common DC progenitors</i>
CLP	Lymphatische Vorläuferzellen „ <i>common lymphoid progenitor</i> “
CMF	Myeloide Vorläuferzellen „ <i>common myeloid progenitor</i> “
Co-SMAD	<i>Common mediator SMAD (4)</i>
Ct	Schwellenwert-Zyklus „ <i>Cycle Threshold</i> “
CXCL	CXC-Chemokin Ligand
CXCR	CXC-Chemokin Rezeptor
DC	Dendritische Zelle
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FLT3	FMS-related tyrosine kinase 3
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
Gapdh	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GMP	Granulozyten-Makrophagen Vorläuferzelle „ <i>granulocyte macrophage progenitor</i> “
HEV	hochendotheliale Venole
Id2	<i>inhibitor of DNA binding 2</i>
IFN	Interferon

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
IgH	Schwere Kette des Immunglobulins „ <i>immunoglobulin heavy chain</i> “
IKDC	<i>interferon-producing killer dendritic cells</i>
IPC	Interferon produzierende Zelle
I-SMAD	Inhibitorischer SMAD (6,7)
KbE	Koloniebildende Einheit
kDa	Kilo Dalton
LC	Langerhanszelle
Lefty	<i>left-right determination factor</i>
MAD	<i>mothers against decapentaplegic</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein Kinase</i>
MH	<i>Mad-homology</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MPP	<i>multipotent progenitor</i>
NO	Stickstoffmonoxid
<i>non</i> -pDC	Nicht definierte Zellpopulation ohne Anteil von pDC
ODN 2216	Oligodesoxynukleotide mit unmethylierten CpG-Motiven in spezifischer Sequenz
pDC	plasmazytoide Dendritische Zelle
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetat
PRR	<i>Pattern-Recognition</i> Rezeptor
R-SMAD	Rezeptor-regulierte <i>SMAD</i> (1,2,3,5,8,9)
RT <sup>2</sup> -PCR	<i>Reverse Transcriptase-Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
Runx1	<i>runt related transcription factor 1</i>
Stat1	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TH <sub>1</sub>	Typ1-T-Helferzellen
TH <sub>2</sub>	Typ2-T-Helferzellen
Tip-DC	<i>TNF and inducible NO-synthase producing DC</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
vg-1	<i>vegetalising factor-1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

## 8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Entwicklung Dendritischer Zellen .....	2
Abbildung 2: pDC verbinden das angeborene mit dem erworbenen Immunsystem.....	6
Abbildung 3: Der TGF- $\beta$ Signalweg.....	12
Abbildung 4: Durchflusszytometrischer Zellsortierung.....	32
Abbildung 5: Isotypkontrolle .....	34
Abbildung 6: Phänotypanalyse nach durchflusszytometrischer Zellsortierung .....	35
Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahmen von DC an Tag 1 <i>post-sort</i> .....	35
Abbildung 8: Expansion von Leukozyten und pDC <i>in vitro</i> .....	41
Abbildung 9: Durchflusszytometrische Analyse des Phänotyps <i>in vitro</i> expandierter pDC .....	42
Abbildung 10: Zellspezifische IFN- $\alpha$ Produktion <i>in vitro</i> expandierter pDC.....	43
Abbildung 11: Expression von Lefty in unstimulierten, <i>in vitro</i> generierten pDC.....	44
Abbildung 12: Expression von Lefty in unstimulierten pDC der Milz <i>ex vivo</i> .....	45
Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse des Phänotyps pulmonaler DC aus Mäusen mit <i>Klebsiella</i> Pneumonie.....	46
Abbildung 14: Lefty Expression bei DC aus mit <i>Klebsiella pneumoniae</i> infizierten Lungen <i>ex vivo</i> .....	46
Abbildung 15: Expression von Lefty bei unstimulierten DC der Milz <i>ex vivo</i> .....	47
Abbildung 16: Zusammenfassende Darstellung der Lefty-Expression von pDC und <i>non</i> -pDC .....	48
Abbildung 17: Proteinkonzentrationen von Lefty in pDC Zelllysat .....	49
Abbildung 18: Lefty hemmt die TGF- $\beta$ Signaltransduktion.....	56

## 9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Zubehör .....	21
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial .....	22
Tabelle 3: Versuchstiere .....	23
Tabelle 4: Verwendete Fluorochrome mit Extinktions- und Emissionswerten .....	24
Tabelle 5: Verwendete Antikörper und Farbstoffe für die FACS-Messungen .....	24
Tabelle 6: Compensation Beads (FACS-Kompensation)/MACS Micro-beads .....	25
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien .....	25
Tabelle 8: Verwendete Zytokin und Proteinfärbung / ELISAs .....	26
Tabelle 9: Verwendete <i>Assays</i> und Primer .....	27
Tabelle 10: Verwendete rekombinante Proteine .....	27
Tabelle 11: Verwendete Stimulanzen .....	36
Tabelle 12: CT-Werte pDC in vitro .....	73
Tabelle 13: CT Dendritischer Zellen der Milz .....	76

# 10 LITERATURVERZEICHNIS

1. Steinman RM, Cohn ZA. **Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution.** *Journal of Experimental Medicine* 1973; 137: 1142–1162
2. Tel J, Lambeck AJA, Cruz LJ, Tacke P, Vries IJM de, Figdor CG. **Human Plasmacytoid Dendritic Cells Phagocytose, Process, and Present Exogenous Particulate Antigen.** *Journal of Immunology* 2010; 184: 4276–4283
3. Hackstein H, Wachtendorf A, Kranz S, Lohmeyer J, Bein G, Baal N. **Heterogeneity of respiratory dendritic cell subsets and lymphocyte populations in inbred mouse strains.** *Respiratory Research* 2012; 13: 94
4. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, et al. **Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application.** *Annual Review of Immunology* 2003; 21: 759–806
5. Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. **Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors.** *Blood* 2001; 97: 3333–41
6. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. **The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting.** *Annual Review of Immunology* 2013; 31: 563–604
7. Corcoran L, Ferrero I, Vremec D, Lucas K. **The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells.** *Journal of Immunology* 2003; 171: 4926–4932
8. D'Amico A, Wu L. **The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3.** *Journal of Experimental Medicine* 2003; 198: 293–303
9. Romani N. **Proliferating dendritic cell progenitors in human blood.** *Journal of Experimental Medicine* 1994; 180: 83–93
10. Reis e Sousa, Caetano, Sher A, Kaye P. **The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection.** *Current Opinion in Immunology* 1999; 11: 392–399
11. Shortman K, Naik SH. **Steady-state and inflammatory dendritic-cell development.** *Nature Reviews Immunology* 2006; 7: 19–30
12. Shortman K, Liu Y. **Mouse and human dendritic cell subtypes.** *Nature Reviews Immunology* 2002; 2: 151–161
13. Banchereau J, Steinman RM. **Dendritic cells and the control of immunity.** *Nature* 1998; 392: 245–252
14. Le Bon A, Tough DF. **Links between innate and adaptive immunity via type I interferon.** *Current Opinion in Immunology* 2002; 14: 432–436
15. Naik SH, Sathe P, Park HY, et al. **Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo.** *Nature Immunology* 2007; 8: 1217–1226
16. **Janeway Immunologie:** Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2014

17. Henri S, Vremec D, Kamath A, et al. **The Dendritic Cell Populations of Mouse Lymph Nodes.** *The Journal of Immunology* 2001; 167: 741–748
18. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. **TNF/iNOS-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection.** *Immunity* 2003; 19: 59–70
19. Lennert K, Remmele W. **Karyometrische Untersuchungen an Lymphknoten-zellen des Menschen.** *Acta Haematologica* 1958; 20: 301–317
20. Facchetti F, Vermi W, Mason D, Colonna M. **The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells.** *Virchows Archiv* 2003; 443: 703–717
21. Siegal FP. **The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood.** *Science* 1999; 284: 1835–1837
22. Liu Y. **IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors.** *Annual Review of Immunology* 2005; 23: 275–306
23. Pestka S, Krause CD, Walter MR. **Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors.** *Immunological Reviews* 2004; 202: 8–32
24. Villadangos JA, Young L. **Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells.** *Immunity* 2008; 29: 352–361
25. Blom B, Ho S, Antonenko S, Liu Y. **Generation of Interferon -Producing Predendritic Cell (Pre-Dc)2 from Human Cd34+ Hematopoietic Stem Cells.** *Journal of Experimental Medicine* 2000; 192: 1785–1796
26. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. **Plasmacytoid dendritic cells in immunity.** *Nature Immunology* 2004; 5: 1219–1226
27. O’Keeffe M, Hochrein H, Vremec D, et al. **Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus.** *Journal of Experimental Medicine* 2002; 196: 1307–1319
28. Gilliet M. **The Development of Murine Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors Is Differentially Regulated by FLT3-ligand and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor.** *Journal of Experimental Medicine* 2002; 195: 953–958
29. Pelayo R, Hirose J, Huang J, et al. **Derivation of 2 categories of plasmacytoid dendritic cells in murine bone marrow.** *Blood* 2005; 105
30. Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu Y. **Natural Interferon / -Producing Cells Link Innate and Adaptive Immunity.** *Journal of Experimental Medicine* 2000; 192: 219–226
31. Soumelis V, Liu Y. **From plasmacytoid to dendritic cell: Morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation.** *European Journal of Immunology* 2006; 36: 2286–2292
32. Iwasaki A, Medzhitov R. **Toll-like receptor control of the adaptive immune responses.** *Nature Immunology* 2004; 5: 987–995
33. Diebold SS. **Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA.** *Science* 2004; 303: 1529–1531
34. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. **Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide.** *Nature* 2007; 449: 564–569
35. Gregorio J, Meller S, Conrad C, et al. **Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons.** *Journal of Experimental Medicine* 2010; 207: 2921–2930
36. Takeda K, Kaisho T, Akira S. **Toll-like Receptors.** *Annual Review of Immunology* 2003; 21: 335–376

37. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, et al. **Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon.** *Nature Medicine* 1999; 5: 919–923
38. Diacovo TG. **Adhesive mechanisms governing interferon-producing cell recruitment into lymph nodes.** *Journal of Experimental Medicine* 2005; 202: 687–696
39. Yoneyama H. **Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules.** *International Immunology* 2004; 16: 915–928
40. Janatpour MJ, Hudak S, Sathe M, Sedgwick JD, McEvoy LM. **Tumor necrosis factor–dependent segmental control of MIG expression by high endothelial venules in inflamed lymph nodes regulates monocyte recruitment.** *Journal of Experimental Medicine* 2001; 194: 1375–1384
41. Krug A, Uppaluri R, Facchetti F, et al. **Cutting Edge: IFN-Producing Cells Respond to CXCR3 Ligands in the Presence of CXCL12 and Secrete Inflammatory Chemokines upon Activation.** *Journal of Immunology* 2002; 169: 6079–6083
42. Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O. **Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation.** *Nature Reviews Immunology* 2011: 823–836
43. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. **Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells.** *Annual Review of Immunology* 2002; 20: 621–667
44. Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. **Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history.** *Cytokine and Growth Factor Reviews* 2008; 19: 3–19
45. Jego G, Palucka AK, Blanck J, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. **Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Plasma Cell Differentiation through Type I Interferon and Interleukin 6.** *Immunity* 2003; 19: 225–234
46. Jego G, Pascual V, Palucka AK, Banchereau J. **Dendritic cells control B cell growth and differentiation.** *Current Directions in Autoimmunity* 2005; 8: 124–139
47. Massagué J, Gomis RR. **The logic of TGF-beta signaling.** *FEBS Letters* 2006; 580: 2811–2820
48. Shi Y, Massagué J. **Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.** *Cell* 2003; 113: 685–700
49. Böttner M, Kriegelstein K, Unsicker K. **The Transforming Growth Factor-βs.** *Journal of Neurochemistry* 2000; 75: 2227–2240
50. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AL, Flavell RA. **Transforming growth factor-beta regulation of immune responses.** *Annual Review of Immunology* 2006; 24: 99–146
51. Liu W, Wang, Cao YL. **TGF-beta: a fibrotic factor in wound scarring and a potential target for anti-scarring gene therapy.** *Current Gene Therapy* 2004; 4: 123–136
52. Werner S, Grose R. **Regulation of wound healing by growth factors and cytokines.** *Physiological Reviews* 2003; 83: 835–870
53. Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. **The role of the TGF-β family in wound healing, burns and scarring: a review.** *International Journal of Burns and Trauma* 2012; 2: 18–28

54. Attisano L. **Signal Transduction by the TGF-beta Superfamily.** Science 2002; 296: 1646–1647
55. Travis MA, Sheppard D. **TGF- $\beta$  Activation and Function in Immunity.** Annual Review of Immunology 2014; 32: 51–82
56. Schmierer B, Hill CS. **TGF $\beta$ –SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility.** Nature Reviews Molecular Cell Biology 2007; 8: 970–982
57. Ramalingam R, Larmonier CB, Thurston RD, et al. **Dendritic Cell-Specific Disruption of TGF- Receptor II Leads to Altered Regulatory T Cell Phenotype and Spontaneous Multiorgan Autoimmunity.** The Journal of Immunology 2012; 189: 3878–3893
58. Strobl H, Knapp W. **TGF- $\beta$ 1 regulation of dendritic cells.** Microbes and Infection 1999; 1: 1283–1290
59. Bonnefoy F, Couturier M, Clauzon A, et al. **TGF- -Exposed Plasmacytoid Dendritic Cells Participate in Th17 Commitment.** The Journal of Immunology 2011; 186: 6157–6164
60. Ulloa L, Creemers JWM, Roy S, Liu S, Mason J, Tabibzadeh S. **Lefty Proteins Exhibit Unique Processing and Activate the MAPK Pathway.** Journal of Biological Chemistry 2001; 276: 21387–21396
61. Tabibzadeh S. **Decoding implantation and menstruation: the tale of two opposing signals.** Frontiers in Bioscience 2002; 7: d1475
62. Yashiro K, Saijoh Y, Sakuma R, et al. **Distinct transcriptional regulation and phylogenetic divergence of human LEFTY genes.** Genes Cells 2000; 5: 343–357
63. Park K. **TGF-beta Family Signaling in Embryonic Stem Cells.** International Journal of Stem Cells 2011; 4: 18–23
64. Tabibzadeh S, Hemmati-Brivanlou A. **Lefty at the Crossroads of “Stemness” and Differentiative Events.** Stem Cells 2006; 24: 1998–2006
65. Meno C, Ito Y, Saijoh Y, et al. **Two closely-related left-right asymmetrically expressed genes, lefty-1 and lefty-2.** Genes to Cells 1997; 2: 513–524
66. Miyazono K. **Positive and negative regulation of TGF-beta signaling.** Journal of Cell Science 2000; 113: 1101–1109
67. Meno C, Shimono A, Saijoh Y, et al. **lefty-1 Is Required for Left-Right Determination as a Regulator of lefty-2 and nodal.** Cell 1998; 94: 287–297
68. Shiratori H, Hamada H. **TGF $\beta$  signaling in establishing left–right asymmetry.** Seminars in Cell and Developmental Biology 2014; 32: 80–84
69. Mason JM, Xu H, Rao SK, et al. **Lefty Contributes to the Remodeling of Extracellular Matrix by Inhibition of Connective Tissue Growth Factor and Collagen mRNA Expression and Increased Proteolytic Activity in a Fibrosarcoma Model.** Journal of Biological Chemistry 2002; 277: 407–415
70. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. **Wound repair and regeneration.** Nature 2008; 453: 314–321
71. Faler BJ, Macsata RA, Plummer D, Mishra L, Sidawy AN. **Transforming growth factor-beta and wound healing.** Perspectives in Vascular Surgery and Endovascular Therapy 2006; 18: 55–62
72. Roberts AB. **Transforming growth factor-beta: activity and efficacy in animal models of wound healing.** Wound Repair and Regeneration 1995; 3: 408–418
73. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. **Growth factors and cytokines in wound healing.** Wound Repair and Regeneration 2008; 16: 585–601

74. O'Kane S, Ferguson, Mark W. J. **Transforming growth factor  $\beta$ s and wound healing.** International Journal of Biochemistry & Cell Biology 1997; 29: 63–78
75. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. **Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring.** Journal of Cell Science 1995; 108: 985–1002
76. Rorison P, Thomlinson A, Hassan Z, Roberts SA, Ferguson MW, Shah M. **Longitudinal changes in plasma Transforming growth factor beta-1 and post-burn scarring in children.** Burns 2010; 36: 89–96
77. Roberts AB, Ashcroft GS, Yang X, et al. **Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response.** Nature Cell Biology 1999; 1: 260–266
78. Hackstein H, Kranz S, Lippitsch A, et al. **Modulation of respiratory dendritic cells during Klebsiella pneumonia infection.** Respiratory Research 2013; 14: 91
79. Sabban S. **Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its high-affinity Fc $\epsilon$ RI receptor.** PhD Thesis University of Sheffield 2011
80. Meno C, Saijoh Y, Fujii H, et al. **Left– right asymmetric expression of the TGF - family member lefty in mouse embryos.** Nature 1996; 381: 151-155
81. Kranz S. **Heterogenität respiratorischer Leukozyten-Subpopulationen unter besonderer Berücksichtigung dendritischer Zellen in Inzuchtmausstämmen im gesunden Tier und unter Infektionsbedingungen.** Dissertation Universität Giessen 2014
82. Asselin-Paturel C, Brizard G, Pin J, Briere F, Trinchieri G. **Mouse Strain Differences in Plasmacytoid Dendritic Cell Frequency and Function Revealed by a Novel Monoclonal Antibody.** The Journal of Immunology 2003; 171: 6466–6477
83. Hassan I, Baret C, Hoffmann S, et al. **Selektive Akkumulation plasmazytoider dendritischer Zellen (PDC) in perithyreoidalen Lymphknoten bei Patienten mit einer Autoimmunthyreopathie vom Typ Morbus Basedow: Bedeutung für das Verständnis von Autoimmunvorgängen.** Chirurgisches Forum 2006: 421-424
84. Blasius AL, Giurisato E, Cella M, Schreiber RD, Shaw AS, Colonna M. **Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2 Is a Specific Marker of Type I IFN-Producing Cells in the Naive Mouse, but a Promiscuous Cell Surface Antigen following IFN Stimulation.** The Journal of Immunology 2006; 177: 3260–3265
85. Geurts van Kessel CH, Bergen IM, Muskens F, et al. **Both Conventional and Interferon Killer Dendritic Cells Have Antigen-Presenting Capacity during Influenza Virus Infection.** PLoS ONE 2009; 4: e7187
86. Durand M, Segura E. **The Known Unknowns of the Human Dendritic Cell Network.** Frontiers in Immunology 2015; 6: 129
87. Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, et al. **Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology.** Nature Immunology 2001; 2: 1144–1150
88. Vogel C, Marcotte EM. **Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses.** Nature Reviews Genetics 2012 13(4):227-32
89. Ulloa L, Tabibzadeh S. **Lefty Inhibits Receptor-regulated Smad Phosphorylation Induced by the Activated Transforming Growth Factor-Receptor.** Journal of Biological Chemistry 2001; 276: 21397–21404

90. Tabibzadeh S. **Homeostasis of extracellular matrix by TGF-beta and lefty.** *Frontiers in Bioscience* 2002; 7: d1231-46
91. Kim D, Cha Y, Ahn H, Kim G, Park K. **Lefty1 and Lefty2 Control the Balance Between Self-Renewal and Pluripotent Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells.** *Stem Cells and Development* 2014; 23: 457-466
92. Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massagué J. **A mechanism of repression of TGF $\beta$ /Smad signaling by oncogenic Ras.** *Genes & development* 1999; 13: 804-816
93. Moore AJ, Anderson MK. **Dendritic Cell Development: A Choose-Your-Own-Adventure Story.** *Advances in Hematology* 2013; 2013: 949513
94. Felker P, Sere K, Lin Q, et al. **TGF- 1 Accelerates Dendritic Cell Differentiation from Common Dendritic Cell Progenitors and Directs Subset Specification toward Conventional Dendritic Cells.** *The Journal of Immunology* 2010; 185: 5326-5335
95. Seré KM, Lin Q, Felker P, et al. **Dendritic cell lineage commitment is instructed by distinct cytokine signals.** *European Journal of Cell Biology* 2012; 91: 515-523
96. Jones CD, Guiot L, Samy M, Gorman M, Tehrani H. **The use of chemotherapeutics for the treatment of keloid scars.** *Dermatology Reports* 2015; 7(2):5880
97. Li X, Liu J, Wu J, Chen D. **The expression of lefty protein in adult normal skin, human embryonic skin and hyperplastic scar.** *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* 2008; 24: 45-47
98. Cheng SK, Olale F, Brivanlou AH, Schier AF. **Lefty Blocks a Subset of TGF $\beta$  Signals by Antagonizing EGF-CFC Coreceptors.** *PLoS Biology* 2004; 2: e30
99. Hackstein H, Lippitsch A, Krug P, et al. **Prospectively defined murine mesenchymal stem cells inhibit Klebsiella pneumoniae-induced acute lung injury and improve pneumonia survival.** *Respiratory Research* 2015; 16: 1-12
100. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdörfer B, Blackwell S, Ballas ZK, et al. **Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- $\alpha/\beta$  in plasmacytoid dendritic cells.** *European Journal of Immunology* 2001; 31: 2154-2163

# 11 ANHANG

**Tabelle 12: CT-Werte pDC *in vitro***

Die pDC wurden *in vitro* aus *murinem* Knochenmark mittels FLT3-Ligand expandiert und vor der Stimulation durchflusszytometrisch aufgereinigt.

Mittelwert  $\pm$  SD; n=3 unabhängige Ergebnisse aus n= 11 Mäusen

Voller Name	Absolute CT-Werte <i>in vitro</i> generierter pDC			
	unstimuliert	Klebsiella p.	ODN	PMA/Iono
Activin A receptor, type 1	24,9	24,5	31,2	26,9
Activin receptor IIA	14,9	17,7	17,8	17,6
Activin A receptor, type II-like 1	22,7	22,9	29,4	24,8
Anti-Mullerian hormone	30,0	31,9	Undetermined	26,8
Anti-Mullerian hormone type 2 receptor	28,0	27,7	35,7	34,8
BMP and activin membrane-bound inhibitor, homolog	25,9	28,9	36,6	34,0
Bone gamma-carboxyglutamate protein 2	24,3	23,5	28,9	25,3
Bone morphogenetic protein 1	29,5	28,7	32,7	28,0
Bone morphogenetic protein 2	Undetermined	30,5	Undetermined	Undetermined
Bone morphogenetic protein 3	36,0	37,1	34,4	35,7
Bone morphogenetic protein 4	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined
Bone morphogenetic protein 5	31,4	36,5	35,2	37,4
Bone morphogenetic protein 6	24,0	23,8	29,3	25,9
Bone morphogenetic protein 7	28,7	32,0	Undetermined	Undetermined
BMP-binding endothelial regulator	Undetermined	Undetermined	Undetermined	36,7
Bone morphogenetic protein receptor, type 1A	29,0	30,0	33,7	28,4
Bone morphogenetic protein receptor, type 1B	30,4	30,9	31,9	31,7
Bone morphogenetic protein receptor, type II	17,6	20,4	24,4	19,5
CD79A antigen (immunoglobulin-associated alpha)	22,0	22,6	28,2	24,0
Cell division cycle 25 homolog A ( <i>S. pombe</i> )	15,9	18,9	20,7	17,7
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	20,2	19,0	22,4	17,6
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	27,3	27,7	37,9	22,9
Chordin	27,8	31,4	33,3	28,4
Collagen, type I, alpha 1	26,3	28,2	27,7	29,2
Collagen, type I, alpha 2	30,4	33,0	Undetermined	Undetermined
Collagen, type III, alpha 1	37,1	36,8	34,7	Undetermined

## Absolute CT-Werte in vitro generierter pDC

Voller Name	unstimuliert	Klebsiella p.	ODN	PMA/Iono
Distal-less homeobox 2	28,5	33,7	Undetermined	Undetermined
Endoglin	21,5	23,6	26,3	23,8
MDS1 and EVI1 complex locus	25,9	26,6	30,5	35,1
FK506 binding protein 1b	24,4	26,4	29,7	26,3
FBJ osteosarcoma oncogene	24,7	24,5	29,4	22,8
Follistatin	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined
Growth differentiation factor 1	21,1	21,6	28,6	23,8
Growth differentiation factor 2	31,2	35,2	33,6	32,6
Growth differentiation factor 3	31,6	30,2	37,4	37,8
Growth differentiation factor 5	37,7	Undetermined	39,1	37,1
Growth differentiation factor 6	Undetermined	37,1	Undetermined	Undetermined
Growth differentiation factor 7	29,4	30,4	34,1	33,3
Goosecoid homeobox	37,1	33,6	34,5	37,1
Inhibitor of DNA binding 1	28,6	29,2	33,4	26,5
Inhibitor of DNA binding 2	16,8	16,6	17,9	15,3
Insulin-like growth factor 1	20,9	24,9	26,4	22,4
Insulin-like growth factor binding protein 3	36,0	34,6	35,2	33,7
Interleukin 6	27,8	29,6	28,7	25,4
Inhibin alpha	26,6	30,9	30,6	32,2
Inhibin beta-A	24,9	27,5	30,0	24,3
Inhibin beta-B	36,6	32,8	36,3	35,2
Integrin beta 5	27,4	29,4	Undetermined	27,3
Integrin beta 7	16,3	16,0	23,6	18,9
Jun oncogene	18,6	20,0	23,4	18,2
Jun-B oncogene	26,3	24,7	29,5	24,9
Left right determination factor 1	13,8	16,5	18,4	17,4
Latent transforming growth factor beta binding protein 1	24,0	23,4	25,9	23,7
Latent transforming growth factor beta binding protein 2	23,4	26,8	37,5	26,0
Latent transforming growth factor beta binding protein 4	25,1	25,2	36,4	31,2
Myelocytomatosis oncogene	30,5	29,6	30,2	23,5
Neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1	18,3	18,6	20,4	21,7
Nodal	34,2	36,8	35,1	34,5
Noggin	30,2	29,6	29,5	30,4
Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	36,1	Undetermined	37,1	36,0
Platelet derived growth factor, B polypeptide	27,0	26,2	Undetermined	22,5
Plasminogen activator, tissue	29,7	31,8	Undetermined	32,0
Plasminogen activator, urokinase	25,9	26,5	Undetermined	22,5
Runt related transcription factor 1	13,8	16,8	18,8	16,4
Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	39,5	Undetermined	38,0	31,3

## Absolute CT-Werte in vitro generierter pDC

Voller Name	unstimuliert	Klebsiella p.	ODN	PMA/Iono
MAD homolog 1 (Drosophila)	20,8	22,9	26,6	23,5
MAD homolog 2 (Drosophila)	20,7	19,7	25,9	21,6
MAD homolog 3 (Drosophila)	18,8	21,7	26,1	23,4
MAD homolog 4 (Drosophila)	17,9	17,4	23,4	19,2
MAD homolog 5 (Drosophila)	16,8	19,6	22,4	19,3
SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	17,0	17,6	20,9	18,8
SRY-box containing gene 4	24,4	26,3	31,0	27,3
Signal transducer and activator of transcription 1	13,5	13,3	15,3	13,7
Teratocarcinoma-derived growth factor 1	34,8	34,8	35,8	29,6
Transforming growth factor, beta 1	15,9	15,5	21,3	16,9
Transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	17,9	21,2	21,9	22,0
TSC22 domain family, member 1	15,5	15,5	21,6	19,4
Transforming growth factor, beta 2	22,7	25,4	Undetermined	26,4
Transforming growth factor, beta 3	26,7	26,8	32,8	28,0
Transforming growth factor, beta induced	24,2	26,6	28,8	24,5
Transforming growth factor, beta receptor I	15,4	15,7	22,4	16,0
Transforming growth factor, beta receptor II	17,2	18,9	23,3	16,9
Transforming growth factor, beta receptor III	26,8	26,5	37,2	30,3
Transforming growth factor, beta receptor associated protein 1	17,5	20,2	24,3	19,9
Glucuronidase, beta	16,7	16,6	23,7	19,5
Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	14,6	17,2	18,7	15,8
Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	12,2	12,2	16,0	12,5
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	13,1	15,5	18,3	13,5
Actin, beta	11,7	11,4	15,8	12,9
Mouse Genomic DNA Contamination	37,6	34,4	35,2	38,5
Reverse Transcription Control	21,0	20,6	20,3	19,5
Reverse Transcription Control	20,0	22,3	19,8	19,0
Reverse Transcription Control	20,9	20,6	20,3	19,5
Positive PCR Control	14,6	16,6	14,3	14,6
Positive PCR Control	15,7	15,2	14,7	14,9
Positive PCR Control	15,2	17,1	14,6	14,9

**Tabelle 13: CT Dendritischer Zellen der Milz**Unstimuliert und nach Stimulation mit *Klebsiella pneumoniae* Lysaten

Voller Name	Absolute CT-Werte von DC isoliert aus <i>murinen</i> Milzen			
	pDC unstimuliert	pDC Klebs.	mDC unstimuliert	mDC Klebs.
Activin A receptor, type 1	32,0	30,9	28,2	25,8
Activin A receptor, type II-like 1	36,4	30,2	24,6	22,3
Activin receptor IIA	22,6	21,7	19,3	19,0
Anti-Mullerian hormone	37,6	35,7	33,5	36,2
Anti-Mullerian hormone type 2 receptor	31,2	32,6	31,9	27,5
BMP and activin membrane- bound inhibitor, homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )	31,8	31,6	32,8	29,3
BMP-binding endothelial regulator	37,9	Undetermined	38,1	39,3
Bone gamma-carboxylglutamate protein 2	31,2	28,0	38,6	37,2
Bone morphogenetic protein 1	29,6	31,8	30,7	25,6
Bone morphogenetic protein 2	Undetermined	Undetermined	31,8	28,8
Bone morphogenetic protein 3	32,6	32,7	32,3	33,4
Bone morphogenetic protein 4	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined
Bone morphogenetic protein 5	35,9	34,3	35,2	38,4
Bone morphogenetic protein 6	30,4	29,0	36,8	27,7
Bone morphogenetic protein 7	37,1	Undetermined	Undetermined	Undetermined
Bone morphogenetic protein receptor, type 1A	31,3	34,7	28,9	30,7
Bone morphogenetic protein receptor, type 1B	29,8	31,3	31,1	30,4
Bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	27,6	25,2	23,2	20,7
CD79A antigen (immunoglobulin-associated alpha)	28,8	25,9	27,4	24,5
Cell division cycle 25 homolog A ( <i>S. pombe</i> )	22,5	22,6	21,7	20,7
Chordin	29,6	31,8	30,5	33,2
Collagen, type I, alpha 1	27,8	28,5	27,5	28,6
Collagen, type I, alpha 2	38,1	Undetermined	37,1	37,2
Collagen, type III, alpha 1	34,5	34,0	34,7	29,6
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	31,2	24,8	20,6	15,5
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	36,3	36,5	19,8	18,2
Distal-less homeobox 2	37,1	35,7	34,9	Undetermined
Endoglin	27,5	25,9	27,8	21,0
FBJ osteosarcoma oncogene	30,0	29,5	27,3	25,8
FK506 binding protein 1b	30,8	35,6	28,2	25,5
Follistatin	39,2	36,8	Undetermined	Undetermined

Voller Name	Absolute CT-Werte von DC isoliert aus <i>murinen</i> Milzen			
	pDC unstimuliert	pDC Klebs.	mDC unstimuliert	mDC Klebs.
Goosecoid homeobox	33,7	33,7	33,5	33,8
Growth differentiation factor 1	31,2	30,4	28,0	24,4
Growth differentiation factor 2	28,1	33,5	30,7	33,4
Growth differentiation factor 3	33,9	37,1	35,6	28,3
Growth differentiation factor 5	36,9	37,0	37,1	37,1
Growth differentiation factor 6	35,6	34,9	33,7	30,6
Growth differentiation factor 7	33,6	34,0	32,6	35,3
Inhibin alpha	30,4	30,6	29,8	30,4
Inhibin beta-A	29,9	30,6	24,3	20,8
Inhibin beta-B	34,2	34,3	31,6	25,4
Inhibitor of DNA binding 1	32,0	32,9	28,7	23,3
Inhibitor of DNA binding 2	21,6	20,2	12,5	11,9
Insulin-like growth factor 1	36,6	Undetermined	24,8	Undetermined
Insulin-like growth factor binding protein 3	32,2	33,8	31,6	34,5
Integrin beta 5	Undetermined	33,8	Undetermined	25,7
Integrin beta 7	24,8	22,8	22,6	21,7
Interleukin 6	36,5	36,3	31,3	21,0
Jun oncogene	28,8	27,7	23,9	18,4
Jun-B oncogene	39,7	35,9	31,6	22,8
Latent transforming growth factor beta binding protein 1	27,6	26,9	27,6	25,9
Latent transforming growth factor beta binding protein 2	33,7	38,4	24,4	24,4
Latent transforming growth factor beta binding protein 4	34,5	35,7	33,2	34,2
Left right determination factor 1	18,9	17,9	28,5	28,6
MAD homolog 1 (Drosophila)	30,2	28,5	27,3	24,4
MAD homolog 2 (Drosophila)	30,2	27,7	26,4	22,4
MAD homolog 3 (Drosophila)	28,2	26,9	27,3	23,5
MAD homolog 4 (Drosophila)	27,7	25,7	23,7	19,7
MAD homolog 5 (Drosophila)	24,5	22,7	21,1	20,9
MDS1 and EVI1 complex locus	32,2	31,9	32,2	30,6
Myelocytomatosis oncogene Neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1	Undetermined	38,1	Undetermined	29,5
Nodal	25,5	22,5	24,4	22,1
Noggin	34,9	33,8	35,2	36,6
Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	29,7	28,7	28,6	29,6
Plasminogen activator, tissue	36,3	33,9	34,0	32,9
Plasminogen activator, urokinase	37,0	Undetermined	30,9	21,8
Platelet derived growth factor, B polypeptide	Undetermined	37,9	34,3	26,6
Runt related transcription factor 1	Undetermined	Undetermined	24,3	20,3
Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	21,6	18,9	17,9	16,8
	Undetermined	Undetermined	Undetermined	26,7

Voller Name	Absolute CT-Werte von DC isoliert aus <i>murinen</i> Milzen			
	pDC unstimuliert	pDC Klebs.	mDC unstimuliert	mDC Klebs.
Signal transducer and activator of transcription 1	19,7	16,7	16,2	13,3
SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	24,5	22,9	19,9	17,6
SRY-box containing gene 4	35,6	35,0	37,2	31,9
Teratocarcinoma-derived growth factor 1	34,0	37,1	34,6	38,0
Transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	25,7	23,8	26,9	25,3
Transforming growth factor, beta 1	25,4	21,8	20,8	17,2
Transforming growth factor, beta 2	Undetermined	Undetermined	30,9	29,5
Transforming growth factor, beta 3	31,8	33,3	29,1	33,8
Transforming growth factor, beta induced	36,7	39,1	21,7	18,6
Transforming growth factor, beta receptor associated protein 1	27,3	24,2	23,2	21,8
Transforming growth factor, beta receptor I	24,9	22,2	22,5	19,3
Transforming growth factor, beta receptor II	27,8	25,4	27,6	22,5
Transforming growth factor, beta receptor III	30,4	36,8	29,4	29,5
TSC22 domain family, member 1	24,8	21,9	25,8	20,4
Glucuronidase, beta	25,7	22,9	21,9	19,9
Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	21,2	20,2	18,0	17,5
Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	19,4	16,5	14,3	12,4
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	22,6	19,5	17,5	15,0
Actin, beta	22,4	18,1	15,8	11,2
Mouse Genomic DNA Contamination	33,0	36,9	34,4	36,5
Reverse Transcription Control	21,3	20,9	19,9	19,8
Reverse Transcription Control	20,7	20,9	20,0	20,0
Reverse Transcription Control	21,3	21,0	20,0	19,7
Positive PCR Control	14,6	14,6	14,4	14,6
Positive PCR Control	15,1	14,9	14,5	14,5
Positive PCR Control	14,9	15,2	14,7	15,2

# 12 ERKLÄRUNG

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, den 19.11.2016



Tilman Hägele

# 13 DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Holger Hackstein möchte ich für die Vergabe des Themas und für die erstklassige Betreuung der Doktorarbeit danken. Zu jedem Zeitpunkt stand er mit hilfreicher und professioneller Unterstützung bereit und ließ nie Zweifel an der Realisierbarkeit des Projektes aufkommen.

Besonderer Dank gebührt auch meiner Betreuerin im Labor Frau Dr. Nelli Baal ohne die das Projekt nicht möglich gewesen wäre. Ihre große Einsatzbereitschaft sowie die sachkundige und erfahrene Unterstützung trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Weiter möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Prof.Dr. Hackstein bedanken. Insbesondere bei Dr. Sabine Kranz, Gabriela Michel und Andreas Wachtendorf, die mich eingearbeitet und während der gesamten Zeit unermüdlich unterstützt haben.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meinen Eltern, meiner Freundin und allen Freunden die mir während der Anfertigung der Doktorarbeit immer liebevoll und unterstützend zur Seite standen.