

Die Rolle von dendritischen Zellen und T-Zellregulation in der Pathogenese des Morbus Whipple

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom-Biologin Katina Schinnerling
aus Dresden

2012

Angefertigt wurde die Arbeit in der Zeit von November 2007 bis Oktober 2012 an der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin unter Leitung von Dr. Verena Moos und Prof. Dr. Dr. Thomas Schneider in der Medizinischen Klinik I für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas Schneider

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Blankenstein

Disputation am: 5. März 2013

Für meine Eltern

*„Das Leben ist wert, gelebt zu werden, sagt die Kunst, die schönste Verführerin;
das Leben ist wert, erkannt zu werden, sagt die Wissenschaft.“*

- Friedrich Nietzsche -

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
BDCA	<i>Blood dendritic cell antigen</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
CCR	CC-Motiv-Chemokinrezeptor
CMV	Cytomegalievirus
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
Cy	Carbocyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol; blau fluoreszierender DNA-Farbstoff
DC	<i>Dendritic cell</i> ; dendritische Zelle
DC-LAMP	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein (in DC bei der Reifung induziert)
DC-SIGN	<i>DC-specific ICAM-3-grabbing non-integrin</i> ; DC-spezifisches ICAM3-bindendes Non-Integrin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EU	<i>Endotoxin units</i> ; Endotoxin-Einheiten
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> ; fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward scatter</i> ; Vorwärtsstreulicht
FOXP3	<i>Forkhead-box-protein 3</i>
GALT	<i>Gut associated lymphoid tissue</i> , Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe
GITR	<i>Glucocorticoid-induced TNF-receptor-related protein</i>

GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<i>high</i>	starke Expression
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> ; interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRIS	<i>Immune reconstitution inflammatory syndrome</i> , inflammatorisches Immunrekonstitutionssyndrom
LAL	<i>Limulus</i> Amöbozyten-Lysat
<i>Lin-1</i>	<i>Lineage-1</i> ; Antikörper-Cocktail zum Ausschluss von Monozyten, B- und T-Lymphozyten, Granulozyten und NK-Zellen
<i>low</i>	schwache Expression
LPS	(bakterielles) Lipopolysaccharid
LSM	<i>Laserscanning</i> -Mikroskop
M-DC	myeloide dendritische Zelle
<i>med</i>	moderate Expression
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex
Mo-DC	aus Monozyten generierte dendritische Zelle
MW	Morbus Whipple
OD	optische Dichte
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i> , Perjodsäure-Schiffsches Reagenz
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> ; mononukleäre Blutzelle
PBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PD-1	<i>Programmed death-1</i>

P-DC	plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> , Konzentration des Wasserstoffs
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> , Mustererkennungs-Rezeptor
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTE	<i>Recent thymic emigrants</i> ; kürzlich aus dem Thymus emigrierte (Thymus-naive) T-Zellen
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SEM	<i>Standard error of the mean</i> ; Standard-Fehler des Mittelwertes
slanDC	6-sulfo LacNAc exprimierende dendritische Zelle
SSC	<i>Side scatter</i> ; Seitwärtsstreulicht
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
T _{CM}	<i>Central memory T cells</i> , zentrale T-Gedächtniszellen
T _{eff}	Effektor-T-Zellen
T _{EM}	<i>Effector memory T cells</i> , T-Effektor-Gedächtniszellen
T _{EMRA}	<i>Terminally differentiated effector memory CD45RA⁺ T cells</i> , terminal differenzierte CD45RA ⁺ T-Effektor-Gedächtniszellen
T _{naiv}	naive T-Zellen
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
TGF	<i>Transforming growth factor</i> ; transformierender Wachstumsfaktor
Th	T-Helferzellen
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor; Toll-ähnlicher Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
<i>T. whipplei</i>	<i>Tropheryma whipplei</i>
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	i
Inhaltsverzeichnis.....	iv
Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis.....	ix
1 Einleitung	1
1.1 Dendritische Zellen und die Initiierung von T-Zellantworten	1
1.1.1 Angeborene und erworbene Immunabwehr	1
1.1.2 Dendritische Zellen	2
1.1.3 Aktivierung und Prägung Antigen-spezifischer T-Zellen	9
1.2 T-Zell-vermittelte Immunität und Toleranz.....	11
1.2.1 T-Helferzellen	11
1.2.2 T-Zellgedächtnis und Homöostase.....	12
1.2.3 Regulatorische T-Zellen	13
1.2.4 T-Zell-Anergie und Erschöpfung	16
1.3 Morbus Whipple – eine seltene chronische Infektionskrankheit	19
1.3.1 Epidemiologie und klinisches Erscheinungsbild des Morbus Whipple	19
1.3.2 Der Erreger <i>Tropheryma whipplei</i>	21
1.3.3 Immunpathogenese des Morbus Whipple	23
1.4 Arbeitshypothese und Fragestellungen	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Material.....	27
2.1.1 Untersuchungsmaterial	27
2.1.2 Antikörper	29
2.1.3 Zytokine und Wachstumsfaktoren.....	32
2.1.4 Antigene und Stimulanzen	33
2.2 Zellkulturtechniken.....	33
2.2.1 Zellkulturbedingungen	33
2.2.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut	34

2.2.3	Magnetische Isolierung von Zellpopulationen	35
2.2.4	Bestimmung der Lebendzellzahl	36
2.2.5	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	37
2.2.6	CFSE-Markierung von Zellen	37
2.2.7	Generierung von DC aus Monozyten	38
2.3	Vollblutstimulation	39
2.4	<i>In vitro</i> -Versuche zur Funktionalität isolierter Zellen	41
2.4.1	Bestimmung der Endozytosekapazität von DC	41
2.4.2	Untersuchung der Phagozytose von <i>T. whipplei</i> durch DC in Zytospins.....	41
2.4.3	Analyse der Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen durch DC.....	42
2.4.4	Untersuchung der Aktivität und Spezifität von T _{reg}	43
2.5	Analytische Durchflusszytometrie.....	44
2.5.1	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	44
2.5.2	Färbung von Oberflächenantigenen auf nativen Zellen	45
2.5.3	Fixierung von Zellen	47
2.5.4	Färbung intrazellulärer Proteine in fixierter Zellen.....	47
2.5.5	Quantifizierung der T-Zellsubpopulationen im Blut.....	48
2.5.6	Analyse von DC-Subpopulationen im Blut.....	49
2.6	Quantifizierung von Zytokinen mittels <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	50
2.7	Mikrobiologische Methoden.....	52
2.7.1	Kultivierung von <i>T. whipplei</i>	52
2.7.2	Herstellung von <i>T. whipplei</i> -Lysat	53
2.7.3	Endotoxin-Nachweis mittels <i>Limulus</i> Amöbozyten-Lysat-Test.....	53
2.8	Histologische Methoden	54
2.8.1	Kurzzeit-Kultur von Duodenalbiopsien mit <i>T. whipplei</i> in der Ussing-Kammer.....	54
2.8.2	Fixierung, Paraffineinbettung und Schneiden von Gewebeproben	54
2.8.3	Entparaffinisierung und Antigendemaskierung von Gewebeschnitten	55
2.8.4	Immunhistologische Färbung	56
2.9	Statistische Auswertung.....	59

3	Ergebnisse.....	60
3.1	Rolle der dendritischen Zellen in der Pathogenese des Morbus Whipple.....	60
3.1.1	Subpopulationen und Phänotyp der DC im Blut von MW-Patienten.....	60
3.1.2	Aktivierbarkeit der M-DC im Blut von MW-Patienten.....	63
3.1.3	Phänotyp und Funktionalität aus Monozyten generierter DC von MW-Patienten.....	67
3.1.4	Einfluss von IL-16 auf Reifung und Funktion der Mo-DC	73
3.1.5	Verteilung der DC in nicht-lymphatischen Geweben von MW-Patienten	75
3.1.6	DC-Populationen und Aktivierung in Lymphknoten von MW-Patienten.....	78
3.2	T-Zellaktivität in Morbus Whipple-Patienten.....	83
3.2.1	Charakterisierung der T-Zellpopulationen im Blut von MW-Patienten.....	83
3.2.2	Einwanderung der T-Zellen in den Darm bei Patienten mit MW	87
3.2.3	Regulatorische T-Zell-Aktivität in MW-Patienten.....	88
3.2.4	Anergie und Hyporesponsivität zirkulierender CD4 ⁺ T-Zellen in MW-Patienten.....	95
4	Diskussion	98
4.1	Ausgangsfragestellung.....	98
4.2	Dendritische Zellen im peripheren Blut von Morbus Whipple-Patienten	99
4.3	Populationen dendritischer Zellen in Geweben von Morbus Whipple-Patienten	100
4.4	Funktionalität dendritischer Zellen in Morbus Whipple-Patienten.....	108
4.5	Beeinflussung dendritischer Zellen durch <i>Tropheryma whipplei</i>	112
4.6	Veränderung der CD4 ⁺ T-Zellpopulation in Morbus Whipple-Patienten.....	114
4.7	T-Zellregulation und Anergie	116
4.8	Modell für die Rolle dendritischer Zellen und regulatorischer T-Zellen in der Pathogenese des Morbus Whipple.....	120
5	Zusammenfassung	122
6	Literaturverzeichnis.....	126
7	Veröffentlichungen.....	159
8	Danksagung	161

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Aktivierung und Polarisierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen durch DC (modifiziert nach [174])	10
Abb. 1.2: Zellkontakt-abhängige und Zytokin-vermittelte Regulationsmechanismen der T_{reg}	16
Abb. 1.3: Verschiedene Verfahren zum Nachweis von <i>T. whipplei</i> in Geweben [287, 310, 309].....	20
Abb. 1.4: Von der Infektion mit <i>T. whipplei</i> zur Entstehung des MW (modifiziert nach [337])	24
Abb. 2.1: Auswertungsbeispiel einer Truocount-Analyse	48
Abb. 2.2: Immunhistologische Färbemethoden	56
Abb. 3.1: DC-Subpopulationen im Blut von MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen.....	61
Abb. 3.2: Reifestatus der zirkulierenden M-DC und P-DC von MW-Patienten und Kontrollpersonen	62
Abb. 3.3: Induktion der Reifung von M-DC ex vivo durch Stimulation mit LPS oder <i>T. whipplei</i>	63
Abb. 3.4: Induktion der Zytokinproduktion in M-DC ex vivo durch Stimulation mit LPS oder <i>T. whipplei</i>	65
Abb. 3.5: Einfluss des Zytokinmilieus auf die IL-12-Expression der M-DC	66
Abb. 3.6: Phänotyp der Mo-DC von MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen	68
Abb. 3.7: Zytokinkonzentration in Kulturüberständen der Mo-DC von MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen.....	69
Abb. 3.8: Endozytosekapazität der unreifen Mo-DC von MW-Patienten und Kontrollpersonen	70
Abb. 3.9: Aufnahme und Lokalisation von <i>T. whipplei</i> in Mo-DC von MW-Patienten	72
Abb. 3.10: Aktivierung Antigen-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen durch Mo-DC von MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen.....	73
Abb. 3.11: Einfluss von IL-16 auf Phänotyp und Funktionalität der Mo-DC	74
Abb. 3.12: DC-Populationen im Duodenum von MW-Patienten und Kontrollpersonen.....	75
Abb. 3.13: Lokalisation von DC und <i>T. whipplei</i> im Duodenum von MW-Patienten und Kontrollpersonen	76
Abb. 3.14: DC-Populationen und <i>T. whipplei</i> in Haut und Synovialmembran von MW-Patienten.....	77
Abb. 3.15: DC-Populationen und Lymphozytenaktivierung in Lymphknoten von MW-Patienten.....	80
Abb. 3.16: Quantifizierung von DC-Populationen und Proliferation in Lymphknoten von MW-Patienten.....	82
Abb. 3.17: Anzahl und Anteil der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen im Blut von MW-Patienten und Kontrollgruppen	84
Abb. 3.18: Konzentration der T-Zellsubpopulationen im Blut von MW-Patienten und Kontrollpersonen	85
Abb. 3.19: Einwanderung von $CD4^+$ und Effektorzellen in den Darm bei MW-Patienten und Kontrollpersonen ..	88
Abb. 3.20: T_{reg} in Lymphknoten von MW-Patienten und Kontrollpersonen	89
Abb. 3.21: T_{reg} in der duodenalen Mukosa von MW-Patienten und Kontrollpersonen	90
Abb. 3.22: Regulatorischer Phänotyp der $CD4^+$ T-Zellen im Blut von MW-Patienten und Kontrollgruppen.....	91
Abb. 3.23: Unspezifische Suppression der $CD4^+$ T-Zellaktivierung durch T_{reg} aus MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen in vitro.....	93
Abb. 3.24: Einfluss der T_{reg} auf die Aktivierung <i>T. whipplei</i> -spezifischer $CD4^+$ T-Zellen in vitro.....	94
Abb. 3.25: Phänotypische Analyse von Anergie und Erschöpfung der $CD4^+$ Effektor-T-Zellen in MW-Patienten und Kontrollpersonen.....	96
Abb. 3.26: Polyklonale und Antigen-spezifische T-Zellantworten in MW-Patienten.....	97

<i>Abb. 4.1: Zusammenhang der DC-Zahl in Duodenum und mesenterialen Lymphknoten von MW-Patienten</i>	<i>102</i>
<i>Abb. 4.2: Zusammenhang zwischen verschiedenen DC-Populationen und der Proliferation in Lymphknoten von MW-Patienten.....</i>	<i>107</i>
<i>Abb. 4.3: Zusammenhang zwischen Proliferation und Generierung von T_{reg} im Lymphknoten und der Präsenz von T_{reg} im Duodenum von MW-Patienten</i>	<i>116</i>
<i>Abb. 4.4: Zusammenhang zwischen DC-Populationen im mesenterialen Lymphknoten und der Präsenz von T_{reg} im Duodenum von MW-Patienten</i>	<i>118</i>
<i>Abb. 4.5: Modell für die Beeinflussung der Immunpathogenese des MW durch DC und T-Zellregulation</i>	<i>121</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1.1: Einteilung der DC-Population in Blut und Geweben</i>	<i>4</i>
<i>Tab. 1.2: Ausgewählte Marker zur phänotypischen Charakterisierung von DC</i>	<i>7</i>
<i>Tab. 1.3: Einteilung in CD4⁺ T-Zellsubpopulationen anhand des Effektorstatus (nach [175, 193, 194])</i>	<i>13</i>
<i>Tab. 1.4: Marker zur phänotypischen und funktionellen Charakterisierung von T-Zellen.....</i>	<i>18</i>
<i>Tab. 2.1: Untersuchte Proben von MW-Patienten und Kontrollpersonen.....</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 2.2: Ausbeute und Reinheit der durch magnetische Isolation erhaltenen Zellpopulationen</i>	<i>36</i>
<i>Tab. 2.3: Anregungs- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome</i>	<i>45</i>
<i>Tab. 2.4: Eingrenzung von DC-Subpopulationen im Blut.....</i>	<i>49</i>
<i>Tab. 3.1: Verteilungsmuster verschiedener DC-Populationen in normalen Lymphknoten</i>	<i>78</i>
<i>Tab. 3.2: Einteilung der Lymphknoten von MW-Patienten in drei Stadien</i>	<i>79</i>
<i>Tab. 3.3: Veränderungen der DC-Population und Proliferation in Lymphknoten von MW-Patienten</i>	<i>83</i>
<i>Tab. 3.4: Prozentuale Verteilung der CD4⁺ T-Zellsubpopulationen im Blut</i>	<i>86</i>

1 Einleitung

1.1 Dendritische Zellen und die Initiierung von T-Zellantworten

1.1.1 Angeborene und erworbene Immunabwehr

Die Ausbildung einer Immunantwort erfordert sofort einsatzfähige Abwehrmechanismen und eine spezifische Anpassung an die Art und Wandlungsfähigkeit des zu bekämpfenden Pathogens. Daher umfasst die Immunabwehr zwei kooperierende Systeme, das angeborene (nicht-spezifische) und das adaptive (spezifische) Abwehrsystem [1].

Das angeborene Immunsystem verfügt über ein begrenztes Arsenal Keimbahn-kodierter Erkennungsrezeptoren (PRR, *pattern recognition receptors*) in löslicher und Membran-gebundener Form, welche die Identifizierung von Pathogenen anhand konservierter molekularer Muster (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) ermöglichen [2, 3, 4]. Komponenten des angeborenen Immunsystems bilden die erste Verteidigungslinie, da sie Pathogene unmittelbar durch stereotyp ablaufende Reaktionen bekämpfen. Durch lösliche Effektormoleküle, wie Akute-Phase-Proteine, Komplementfaktoren, Kollektine und Defensine, werden eingedrungene Pathogene lysiert oder zur verbesserten Erkennung und Aufnahme durch phagozytierende Zellen markiert (opsonisiert) [1, 5, 6]. Phagozyten, zu denen Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen (DC, *dendritic cell*) gehören, nehmen Pathogene auf und eliminieren diese, z.B. über die Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies [7]. Darüber hinaus sind Makrophagen und DC in der Lage, Bestandteile der Pathogene zu kurzen Antigenpeptiden zu prozessieren und diese an Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, *major histocompatibility complex*)-Moleküle gebunden auf der Zelloberfläche zu präsentieren [8]. Nach der Erkennung von PAMP setzen die Zellen der angeborenen Abwehr, wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, DC und natürliche Killer (NK)-Zellen Zytokine, Chemokine und Entzündungsmediatoren frei, die weitere Immunzellen anlocken und die adaptiven Abwehrmechanismen aktivieren [1].

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem verfügt das adaptive Immunsystem über ein nahezu unbegrenztes Arsenal an Erkennungsstrukturen, womit es in der Lage ist, sich an die Diversität und Wandlungsfähigkeit der zu bekämpfenden pathogenen Mikroorganismen anzupassen [9]. Pathogenspezifische Abwehrmechanismen müssen nach der Infektion erst ausgebildet werden und sind daher mit einer Verzögerung von vier bis sieben Tagen einsatzbereit [10]. Dafür zeichnet sich die adaptive Immunabwehr durch eine hohe Spezifität in der Erkennung des Erregers, die Flexibilität in Art und Stärke der Reaktion [9] sowie die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus, wodurch erneute Infektionen mit demselben Erreger schneller und effizienter bekämpft werden können [1, 11]. Lymphozyten sind die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems [12]. B-Lymphozyten entwickeln sich im Knochenmark und erkennen Antigene über Immunglobuline (Ig), die sie als Membran-

gebundene Rezeptoren (B-Zell-Rezeptoren) auf ihrer Oberfläche tragen [1]. Einige B-Zellen differenzieren nach der Aktivierung in Plasmazellen und sezernieren Ig als spezifische Antikörper, welche eingedrungene Pathogene opsonisieren, immobilisieren oder deren Toxine neutralisieren [13]. Für die Abwehr intrazellulärer Pathogene sind T-Lymphozyten entscheidend. T-Lymphozyten entwickeln sich im Thymus und verfügen über einen spezifischen T-Zellrezeptor, mit dem sie bestimmte Antigenpeptide gebunden an MHC-Moleküle auf der Oberfläche Antigen präsentierender Zellen erkennen [14]. Anhand der Expression der beiden Korezeptoren des T-Zellrezeptors, CD4 und CD8, lassen sich zwei funktionell verschiedene T-Lymphozyten-Populationen unterscheiden. Die CD8⁺ T-Zellen identifizieren MHC-Klasse I-dargebotene endogene (zelleigene) Antigenpeptide [15] und entwickeln sich nach der Aktivierung zu zytotoxischen T-Zellen, die infizierte oder entartete Zellen durch zytotoxische Effektormoleküle eliminieren [16, 17]. Dagegen erkennen CD4⁺ T-Zellen MHC-Klasse II-präsentierte exogene (aufgenommene) Antigenpeptide [18] und können zu T-Helferzellen (Th) differenzieren, welche die Immunantwort über die Sekretion von Zytokinen steuern [19].

1.1.2 Dendritische Zellen

Die DC verknüpfen angeborene und adaptive Abwehrmechanismen und bilden so eine entscheidende Schaltstelle bei der Induktion spezifischer Immunantworten [20]. Dabei erkennen die DC Pathogene selbst, verarbeiten aber auch Signale von anderen Immunzellen der angeborenen und adaptiven Abwehr [21] und sind somit befähigt, T-Lymphozyten auf eine den Erfordernissen angepasste Immunreaktion zu programmieren [22, 23].

Zusammen mit Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten gehören DC zu den professionellen Antigen präsentierenden Zellen. Diese exprimieren neben MHC-Klasse I-Molekülen, die auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen zu finden sind, zusätzlich MHC-Klasse-II-Moleküle und sind in der Lage, Antigen-spezifische T-Lymphozyten zu aktivieren [24]. Im Vergleich zu den anderen Antigen präsentierenden Zellen zeigen DC jedoch eine wesentlich stärkere Expression von MHC-Klasse II und kostimulatorischen Molekülen [25] sowie des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin (IL)-12 [26], was ihnen die besondere Fähigkeit verleiht, bei einer erstmaligen Infektion mit einem Erreger, effizient naive T-Zellen zu aktivieren [24].

Subpopulationen und Entwicklung dendritischer Zellen

Bereits 1868 entdeckte Paul Langerhans in der Epidermis die nach ihm benannten Langerhanszellen, die er aufgrund ihrer Dendriten-artigen Ausläufer jedoch für Nervenzellen hielt [27]. Erst im Jahr 1973 wurden DC von Ralph M. Steinman und Zanvil A. Cohn als eigenständige Zellpopulation in der Milz von Mäusen beschrieben und charakterisiert [28]. Heute werden DC als eine heterogene Zellpopulation angesehen, die im Allgemeinen anhand der Expression myeloider und lymphoider Marker in myeloide (M-) DC und plasmazytoide (P-) DC unterteilt werden kann [29] (Tab. 1.1).

Für P-DC ist eine hohe Konzentration der IL-3-Rezeptor- α -Kette (CD123) und die Expression des C-Typ-Lektins *blood dendritic cell antigen* (BDCA)-2, das der Internalisierung von Antigenen dient, charakteristisch [30, 31] (Tab. 1.1, Tab. 1.2). Die P-DC erkennen virale Einzelstrang-RNA und unmethylierte Cytosin/Guanin-Motive bakterieller DNA und produzieren nach der Aktivierung große Mengen Interferon (IFN) Typ I [32, 33]. Bei der Abwehr viraler Infektionen [30, 34], aber auch bei der Regulation von Immunantworten [35, 36] spielen P-DC in Blut und Lymphknoten eine Rolle.

Die M-DC sind durch die Expression der α -Untereinheit des Komplement-Rezeptors 4 (CD11c) gekennzeichnet und bilden eine heterogene Population (Tab. 1.1) [37]. Diese umfasst die nahe verwandten M-DC1 und M-DC2 [38] sowie eine weitere, durch die Expression des niedrig-affinen Rezeptors für IgG (CD16) gekennzeichnete Subpopulation [37] mit einem hohen entzündlichen Potenzial [39]. Zu den Letztgenannten gehören u.a. die slanDC, welche Monozyten ähneln und 6-sulfo LacNAc (M-DC8), eine Kohlenhydrat-Modifikation des P-Selektin-Glykoprotein-Liganden 1 exprimieren (Tab. 1.2) [40]. Im Blut werden slanDC durch Erythrozyten an der Ausreifung und Zytokin-Produktion gehindert [41], sind aber nach der Einwanderung in die Gewebe an Entzündungsreaktionen beteiligt [42]. Die M-DC1 exprimieren das MHC-artige Glykoprotein CD1c (Tab. 1.2), das für die Präsentation von Lipidantigenen, z.B. aus der Zellwand von Bakterien, gegenüber CD1-restringierten T-Zellen erforderlich ist [43, 44]. Nach der Aktivierung produzieren M-DC1 vor allem Chemokine, die anti-inflammatorische T-Lymphozyten rekrutieren, und nur geringe Mengen entzündlicher Zytokine [39, 45, 46]. Die M-DC2 sind durch die Expression von Thrombomodulin (CD141; Tab. 1.2) gekennzeichnet [47], welches unter anderem der Inaktivierung von Komplement dient [48] und mit der Induktion allergischer Immunantworten assoziiert ist [49]. Bezeichnend für M-DC2 ist deren Fähigkeit zur Kreuzpräsentation von aufgenommenen Bestandteilen nekrotischer Zellen gegenüber CD8⁺ T-Zellen [50].

Der Anteil der DC an mononukleären Zellen beträgt im peripheren humanen Blut etwa ein Prozent [53] und umfasst unter homöostatischen Bedingungen DC-Vorläufer [54] und unreife DC [55, 56]. Zu den Gewebeformen der DC gehören u.a. interstitielle DC in nicht-lymphatischen Geweben, Langerhanszellen der Haut und interdigitierende DC in lymphatischen Organen (Tab. 1.1) [24].

Tab. 1.1: Einteilung der DC-Population in Blut und Geweben

DC-Subpopulation	Vorkommen	spezifische Marker	Referenzen
Myeloide DC		CD11c ⁽¹⁾	[57, 58]
M-DC1	Blut, Lymphknoten	CD1c ⁽²⁾	[47, 59, 37]
M-DC2	Blut, Lymphknoten	CD141	[47, 59, 37]
slanDC	Blut, entzündliche Gewebe	M-DC8, CD16 ⁽¹⁾⁽³⁾	[37, 40, 42]
interstitielle DC	nicht-lymphatische Gewebe	DC-SIGN, S-100	[60, 61, 59, 62]
Langerhanszellen	Epidermis (Oberhaut)	Langerin, CD1a, S-100	[61, 63, 64]
interdigitierende DC	T-Zellzone der Lymphknoten	S-100, CD1a	[61, 59, 65]
		reife DC: CD83, DC-LAMP	[66, 67, 59]
Plasmazytoide DC	Blut, Lymphknoten	CD123 ⁽²⁾ , BDCA-2	[30, 68]

Einige Antigene werden auch von anderen Zellen exprimiert (⁽¹⁾ Monozyten/Makrophagen [69]; ⁽²⁾ B-Lymphozyten [70, 71]; ⁽³⁾ Granulozyten [58]) deswegen sind die Marker nur bei Eingrenzung der CD3⁻CD19⁻CD14⁻HLA-DR⁺ Population aussagekräftig.

Im Knochenmark werden P-DC und Vorstufen der M-DC kontinuierlich aus einem gemeinsamen DC-Vorläufer (CDP, *common DC precursor*) gebildet [72] und wandern über das Blut in lymphatische Organe ein [73], wo sie zu interdigitierenden DC differenzieren. Vorläufer der M-DC migrieren auch in nicht-lymphatische Gewebe, wie die Lamina propria des Darms, und entwickeln sich dort zu spezialisierten Gewebeformen [74]. Unter homöostatischen Bedingungen wird die DC-Population im Gewebe durch eine geringe Zellteilung aufrechterhalten [75]. Bei Entzündungen oder Infektionen werden jedoch zusätzlich Monozyten aus dem Blut ins Gewebe rekrutiert und differenzieren dort zu interstitiellen DC mit einem hohen inflammatorischen Potenzial [76, 77]. Diese sog. Mo-DC sekretieren entzündliche Zytokine, induzieren T-Zellantworten [78, 79] und übernehmen eine entscheidende Funktion bei der Abwehr bakterieller Krankheitserreger [80].

In vitro können DC entweder aus hämatopoetischen Vorläuferzellen [81] oder aus Monozyten [82] aus dem Blut generiert werden. Monozyten, die mit Granulozyten Monozyten-Wachstumsfaktor (GM-CSF) und IL-4 kultiviert werden, differenzieren zu unreifen Mo-DC, wobei sie ihren kennzeichnenden Marker CD14 (Tab. 1.2), eine Komponente des LPS-Rezeptorkomplexes [83], herunterregulieren [84].

Da myeloide DC-Populationen - dazu gehören neben den klassischen M-DC auch Mo-DC – bei bakteriellen Infektionen im Gewebe eine entscheidende Rolle in der Aufnahme von Antigenen [85] und der Initiierung Antigen-spezifischer T-Zellantworten spielen [86], werden diese im Folgenden, wenn nicht anders hervorgehoben, allgemein als „DC“ bezeichnet.

Antigenaufnahme und Reifung der dendritischen Zellen

Die Fähigkeit der DC, im Gewebe Antigene aufzunehmen, in lymphatische Organe einzuwandern und die Antigene dort T-Zellen zu präsentieren, ist entscheidend für die Initiierung von Immunantworten [20]. Im Verlauf der Migration erfahren die DC einen Reifungsprozess, wobei sie sich von Antigen-aufnehmenden zu Antigen präsentierenden Zellen umwandeln [24, 87].

Die Aufnahme von Antigenen durch unreife DC im Gewebe kann über Makropinozytose, Phagozytose oder Rezeptor-vermittelt erfolgen. Hierzu exprimieren unreife DC Komplement-Rezeptoren (CR3: CD11b/CD18, CR4: CD11c/CD18) [5, 88] und IgG-bindende Fc-Rezeptoren (Fc γ RI: CD64, Fc γ RII: CD32, Fc γ RIII: CD16) [89, 90], über die sie opsonisierte Partikel binden und internalisieren. Zudem verfügen DC über C-Typ Lektin-Rezeptoren, wie Makrophagen-Mannose-Rezeptor [87] und *DC-specific ICAM-3-grabbing non-integrin* (DC-SIGN) (Tab. 1.2), mit denen sie verschiedene Pathogene anhand ihrer charakteristischen Kohlenhydratstrukturen erkennen und internalisieren [62, 91]. Die Protein-Bestandteile der aufgenommenen Antigene werden in spezialisierten endosomalen Kompartimenten zu kurzen Peptiden prozessiert und, an MHC-Klasse II-Moleküle gebunden, auf der Zelloberfläche dargeboten [8]. Alternativ können internalisierte Antigene aus dem Endozytose-Kompartiment zum proteolytischen Abbau ins Zytosol entlassen, ins endoplasmatische Retikulum transportiert und auf MHC-Klasse I-Molekülen kreuzpräsentiert werden [90]. Die Präsentation von Lipid- und Glykolipid-Antigenen erfolgt dagegen über die MHC-artigen CD1-Moleküle, welche von CD1-restringierten T-Zellen erkannt werden [91]. Im Gegensatz zu Makrophagen benötigen DC lediglich picomolare Konzentrationen an Antigen für eine effiziente Antigenpräsentation [87]. Das liegt daran, dass DC deutlich weniger lysosomale Proteasen besitzen als Makrophagen, welche auf die Beseitigung von Pathogenen spezialisiert sind. Die verringerte Proteolyse in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten der DC begünstigt die Generierung von Antigenpeptiden für die Präsentation auf MHC-Klasse II-Komplexen [92, 93]. Diese MHC-Klasse II-Kompartimente sind in reifenden DC durch das Lysosomen-assoziierte Membranprotein DC-LAMP gekennzeichnet [64] (Tab. 1.2).

Zur Erkennung pathogener Strukturen besitzen DC verschiedene PRR auf der Zelloberfläche, zu denen neben den C-Typ Lektin-Rezeptoren vor allem Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR, *Toll-like receptors*) gehören [94]. Diese erkennen u.a. bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien (TLR4) [95] oder Peptidoglykan, Lipopeptide und Lipoteichonsäure grampositiver Bakterien (TLR2) [96] (Tab. 1.2). Die Bindung des entsprechenden Liganden an einen TLR führt zur Induktion von Signalkaskaden und dadurch zu einer Aktivierung der DC [96, 97]. Für die vollständige Ausreifung und die Produktion inflammatorischer Zytokine ist jedoch eine anhaltende Stimulation der DC erforderlich [98]. Hierfür besitzen DC auch intrazelluläre PRR, mit denen sie nach der Antigenaufnahme PAMP in Endosomen oder im Zytosol identifizieren. Zu diesen intrazellulären PRR gehören neben TLR in endosomalen Kompartimenten [94], auch die im Zytosol vorkommenden NOD (*nucleotide binding and oligomerization domain*)-artigen

Rezeptoren (NLR, *Nod-like receptors*) zur Erkennung bakterieller Produkte und die RIG (*retinoid acid-inducible gene*)-I-artigen Rezeptoren (RLR, *RIG-I-like receptors*) zur Detektion viraler RNA [99, 2]. Die synergistische Stimulation verschiedener PRR verstärkt die Ausreifung und Aktivierung der DC [100, 101]. Ebenso können endogene Gefahrensignale, z.B. Hitzeschockproteine, Defensine und ATP sowie die Bindung von Immunkomplexen an aktivierende Fc-Rezeptoren zur Aktivierung der DC beitragen [102].

Auch inflammatorische Zytokine und Entzündungsmediatoren, wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α , IL-1 β , IL-6 und Prostaglandin (PG) E₂, die von aktivierten Zellen der angeborenen Immunabwehr sekretiert werden, lösen eine Reifung der DC aus [103, 104].

Während der Reifung regulieren die DC Rezeptoren, die für die Antigenaufnahme nötig sind, herunter [85]. Dagegen wird die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86, CD80 und CD40 sowie des Adhäsionsmoleküls CD54 (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule*) verstärkt [20]. Charakteristisch für ausgereifte DC ist die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD83, welches nicht auf unreifen DC vorkommt [105, 106]. Die Reifung erhöht in den DC zudem die Synthese von MHC-Molekülen und den Transport von MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexen aus endosomalen/lysosomalen Kompartimenten an die Zelloberfläche [107].

Migrationsverhalten der dendritischen Zellen

Im Zuge der Ausreifung ändern DC ihr Chemokinrezeptorprofil und damit ihr Migrationsverhalten [108, 109]. Unreife DC exprimieren die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1 und CXCR4 und wandern infolge der Bindung der korrespondierenden Chemokin-Liganden CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CXCL12 oder IL-8 in nicht-lymphatische Gewebe ein [110, 111]. Nach der Aktivierung produzieren die DC selbst Chemokine wie CCL3, CCL4 und CCL5, mit denen sie weitere DC-Vorläufer aus dem Blut rekrutieren [112]. Die Reifung induziert die Expression von CCR7, wodurch die DC die Fähigkeit erhalten, in Reaktion auf die Chemokine CCL19 und CCL21 über die afferente Lymphe in die drainierenden lymphatischen Organe einzuwandern [113].

Tab. 1.2: Ausgewählte Marker zur phänotypischen Charakterisierung von DC

<i>Antigen</i>	<i>Synonym</i>	<i>Funktion</i>	<i>Referenzen</i>
Antigenaufnahme			
CD11b	CR3A, α_M	Untereinheit des Komplementrezeptors CR3 (CD11b/CD18, $\alpha_M\beta_2$); Stimulation der Phagozytose, Erkennung von Komplement iC3b	[5, 114]
CD11c	CR4A, α_X	Untereinheit des Komplementrezeptors CR4 (CD11c/CD18, $\alpha_X\beta_2$); Stimulation der Phagozytose, Erkennung von Komplement iC3b	[5, 114]
CD16	Fc γ RIII	niedrig affiner Rezeptor für IgG; bindet an Ig-Komplexe, stimuliert Phagozytose opsonisierter Mikroorganismen; aktivierend	[87]
CD64	Fc γ RI	hoch affiner Rezeptor für IgG; Bindung an monomeres IgG und Ig-Komplexe, stimuliert Phagozytose opsonisierter Mikroorganismen, aktivierend	[87, 115]
BDCA-2	CD303	Internalisierung von Antigenen zur Präsentation gegenüber T-Zellen	[66]
Pathogen-Erkennung			
DC-SIGN	CD209	C-Typ-Lektin; Erkennung Mannose-haltiger Glykokonjugate von Pathogenen; Internalisierung von Antigenen zur Präsentation gegenüber T-Zellen; Interaktion mit T-Zellen über Bindung an ICAM-3; Rollen am Endothel durch Bindung an ICAM-2	[116, 60, 89]
CD14		Teil des LPS-Rezeptor-Komplex; Erkennung von LPS	[94, 81]
TLR2	CD192	PRR; Erkennung von Lipopeptiden, Peptidoglykan und Lipoteichonsäure grampositiver Bakterien und Zymosan von Pilzen	[96, 94]
TLR4	CD194	PRR; Erkennung von LPS gramnegativer Bakterien, Lipoteichonsäure und Hitzeschockproteinen	[95, 94]
Migration (Chemokinrezeptoren)			
CCR2	CD192	Migration in entzündliche Gewebe entlang Gradienten von CCL2 (MCP-1)	[73, 112]
CCR5	CD195	Migration in entzündliche Gewebe entlang Gradienten von CCL3/4 (MIP-1 α/β) oder CCL5 (RANTES)	[110, 118]
CCR6	CD196	Migration in entzündliche Gewebe entlang Gradienten von CCL20 (MIP-3 α)	[109, 30]
CCR7	CD197, EBI1	Migration in T-Zell-Areale der Lymphknoten entlang Gradienten von CCL19 (ELC) oder CCL21 (SLC)	[109, 119]
CX ₃ CR1		Adhäsion und Migration durch Bindung von CX ₃ CL1 (Fraktalkin)	[120, 121]
Antigenprozessierung und Präsentation			
DC-LAMP*	CD208, LAMP3	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein in reifen DC; Beteiligung an Beladung von MHC-Klasse II-Molekülen mit Antigenpeptiden	[64, 122]
HLA-DR		MHC-Klasse II Molekül; Präsentation von Antigenpeptiden zur Stimulation von CD4 ⁺ T-Zellen mit passendem T-Zellrezeptor	[123, 124]
CD1a		Präsentation von Lipid-Antigenen gegenüber CD1-restringierten T-Zellen	[44]
CD1c	BDCA-1	Präsentation von Lipid-Antigenen gegenüber CD1-restringierten T-Zellen	[44, 43]
Kostimulation/Inhibition			
CD40		Aktivierung und Verstärkung der IL-12 Produktion durch Bindung an CD40-Ligand (CD154) auf aktivierten T-Lymphozyten	[125, 126]
CD80	B7-1, BB1	Kostimulation von T-Lymphozyten durch Bindung an CD28, Inhibition durch Bindung an CTLA-4	[127, 128, 129]
CD83		Aktivierung von T-Lymphozyten (in membrangebundener Form)	[107, 106]
CD86	B7-2, B70	Kostimulation von T-Lymphozyten durch Bindung an CD28, Induktion von Toleranz durch Bindung an CTLA-4	[129, 130]
PD-L1	CD274, B7-H1	Inhibition der T-Lymphozyten-Aktivierung durch Bindung an PD-1; Induktion von Anergie und T _{reg}	[131, 132, 133]

sonstige			
CD123	IL-3R α	Untereinheit des IL-3-Rezeptors; Wachstum und Differenzierung	[134]
CD141	BDCA-3	Thrombomodulin; Inaktivierung von Komplement (C3b, Anaphylatoxine C3a und C5a)	[47, 48]
slan	M-DC8	Kohlenhydrat-Modifikation des P-Selektin-Glykoprotein-Liganden 1 (PSGL-1); verhindert Bindung von PSGL-1 an E-, P- und L-Selektin	[40]
S-100*		Ca ²⁺ -bindendes Protein; Beteiligung u.a. an Protein-Phosphorylierung, Ca ²⁺ -Homöostase, Zytoskelett-Dynamik, Proliferation, Differenzierung	[59, 135]

CD, *cluster of differentiation*; CR, *complement receptor*; Ig, Immunglobulin; BDCA, *blood DC antigen*; DC-SIGN, *DC-specific ICAM-3-grabbing non-integrin*; PRR, *pattern recognition receptor*; LPS, Lipopolysaccharid; TLR, *Toll-like-Rezeptor*; CCR, *CC-Motiv-Chemokinrezeptor*; CCL, *CC-Motiv-Chemokin-Ligand*; ICAM, *intercellular adhesion molecule*; MCP, *monocyte chemoattractant protein*; MIP, *Makrophagen-inflammatorisches Protein*; RANTES, *regulated upon activation normal T cell expressed and secreted*; EB11, *Epstein-Barr virus-induced molecule 1*; SLC, *secondary lymphoid organ chemokine*; ELC, *EB11-Ligand-Chemokin*; LAMP, *Lysosomen-assoziiertes Membranprotein*; HLA, *humanes Leukozyten-Antigen*; MHC, *major histocompatibility complex*; CTLA-4, *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*; PD-1, *programmed death 1*; T_{reg}, *regulatorische T-Zellen*; slan, *6-sulfo LacNAc*; * intrazelluläre Expression.

Zytokinproduktion der dendritischen Zellen

Reife DC produzieren verschiedene Zytokine in einem jeweils begrenzten Zeitfenster [136], welche andere Immunzellen, aber auch die DC selbst beeinflussen [99]. Die Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β werden bereits kurz nach der Aktivierung freigesetzt und wirken daher noch im betroffenen Gewebe, indem sie z.B. weitere DC-Vorläufer aus dem Blut rekrutieren [136]. Dagegen erfolgt die Sekretion von IL-12 zeitlich verzögert und scheint vor allem im Lymphknoten die T-Zellaktivierung zu beeinflussen [136].

Bei IL-12 handelt es sich um ein heterodimeres Zytokin, das aus den beiden kovalent verknüpften Untereinheiten p35 (IL-12 α) und p40 (IL-12 β) besteht und entscheidend für die Induktion von Th1-Antworten ist [137, 138, 139] (Kap. 1.1.3). Während die p40-Untereinheit im Überschuss produziert wird, ist die p35-Untereinheit der limitierende Faktor für die Bildung von bioaktivem IL-12p70 [140]. Die heterodimere Form von IL-12 wirkt pleiotrop auf verschiedene Zelltypen und induziert u.a. in T-Zellen und NK-Zellen die Produktion von IFN- γ [138]. Dagegen ist die biologische Funktion von freiem p40 kontrovers diskutiert, scheint aber in der chemotaktischen Attraktion von Phagozyten zu liegen [141]. Die IL-12-Produktion der DC erfordert starke Aktivierungssignale [142] und wird durch die Präsenz von Zytokinen und Mediatoren beeinflusst [138]. Während IL-4 und IFN- γ die IL-12-Produktion verstärken [143, 144], wirken IFN- α [145], IL-10 [146], PGE₂ [105] und *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) [147] inhibitorisch. Je nach Art und Stärke der PRR-Stimulation und der Präsenz von IFN- γ wird in den DC entweder die Produktion von IL-12 oder von IL-23 begünstigt [148, 97]. Ebenso wie IL-12 enthält auch IL-23 die p40-Untereinheit, welche jedoch mit p19 zu einem Heterodimer verknüpft ist [149]. Die Wirkung von IL-23 besteht vor allem darin, die Th17-Differenzierung über die Induktion der IL-22-Produktion zu stabilisieren [150, 151] (Kap. 1.1.3). Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 wird erst in der späten Phase der

Immunantwort maximal produziert [136] und ist an der Regulation von Immunantworten beteiligt [152] (Kap. 1.1.3).

1.1.3 Aktivierung und Prägung Antigen-spezifischer T-Zellen

Voraussetzung für eine Aktivierung der Antigen-spezifischen T-Zellen und deren Differenzierung in Effektorzellen ist der Kontakt zu ausgereiften DC, die neben an MHC-Komplexe gebundenen Antigenpeptiden auch kostimulatorische Moleküle exprimieren und inflammatorische Zytokine sekretieren [153].

Die Prägung naiver Antigen-spezifischer T-Zellen durch DC findet in sekundären lymphatischen Organen statt [154]. Im Gegensatz zu B-Lymphozyten, die durch residente folliculäre DC (stromalen Ursprungs) in den B-Zell-Follikeln des Cortex stimuliert werden, erfolgt die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Lymphozyten in den T-Zell-Arealen des Paracortex [155]. Dort treffen die über Hochendothelvenolen aus dem Blut eingewanderten naiven T-Zellen auf Antigen-beladene DC [155, 156]. Pro Tag wird eine DC von etwa 12 000 T-Zellen nach einem passenden Antigen abgesucht [157]. Hierfür wird ein kurzzeitiger Kontakt zwischen DC und T-Zelle durch die Interaktion verschiedener Adhäsionsmoleküle, wie z.B. ICAM-1 auf der Oberfläche der DC mit LFA (*lymphocyte function associated antigen*)-1 auf der Seite des T-Lymphozyts, hergestellt [20]. Erkennt die T-Zelle über ihren spezifischen T-Zellrezeptor ein geeignetes Antigen, das in Form eines MHC-Peptid-Komplexes von der DC dargeboten wird, erhält sie ein Aktivierungssignal [158], das die Spezifität der Immunantwort vermittelt (Abb. 1.1). Durch die gleichzeitige Bindung des entsprechenden Korezeptors, CD4 oder CD8, an dasselbe MHC-Molekül wird der Kontakt zwischen DC und T-Zelle stabilisiert [159].

Naive T-Zellen benötigen für die Aktivierung jedoch neben der T-Zellrezeptor-Stimulation durch das passende Antigenepitop ein zusätzliches kostimulatorisches Signal [153] (Abb. 1.1). Dieses wird von der DC über die Bindung der Moleküle CD86 oder CD80 an CD28 auf der Oberfläche der T-Zellen bereitgestellt und verstärkt die über den T-Zellrezeptor initiierte Signalkaskade um das 100-fache [160]. Fehlt das kostimulatorische Signal, so werden die Antigen-spezifischen T-Zellen anerg – ein Mechanismus, auf dem auch die Ausbildung der Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen beruht (Kap. 1.2.4).

Aktivierungssignale induzieren in den T-Zellen neben der Proliferation auch die Expression von Genen für den Wachstumsfaktor IL-2 und die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25), der dadurch hochaffin wird [161]. Die autokrine Wirkung von IL-2 verstärkt die Proliferation der aktivierten T-Zellen zusätzlich, so dass ein Klon mit T-Zellrezeptoren derselben Spezifität entsteht [155]. Aktivierte Antigen-spezifische T-Zellen exprimieren zudem kurzzeitig CD40-Ligand (CD40L; Tab. 1.4) [162], der an CD40 auf der Oberfläche der DC bindet und so wiederum in den DC eine

Verstärkung der Expression kostimulatorischer Moleküle (CD86, CD80) und der Produktion des Zytokins IL-12 hervorruft [126, 163].

Für eine Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen in Effektorzellen ist neben einer andauernden T-Zellrezeptor-Stimulation [160] und der Signalverstärkung durch kostimulatorische Moleküle ein zusätzliches polarisierendes Zytokin-Signal erforderlich [153] (Abb. 1.1). Für eine Polarisierung in Richtung IFN- γ -sekretierender Th1-Zellen spielt das von den DC produzierte IL-12 eine entscheidende Rolle [142]. Der Einfluss von IL-4 und die Abwesenheit von IL-12 führen hingegen über die Interaktion von OX40-Ligand auf DC mit OX40 auf der T-Zelloberfläche zur Induktion von Th2-Antworten [164, 165]. Auch DC, die zum Zeitpunkt der Ausreifung unter dem Einfluss des regulatorischen Zytokins IL-10 standen, induzieren Th2-Antworten [166]. Die Differenzierung in IL-17 und IL-22 produzierende Th17-Zellen [167] wird dagegen durch eine Kombination von IL-1 β mit IL-23, IL-6 oder *transforming growth factor* (TGF)- β ausgelöst [168, 169, 170]. Unter suboptimalen Bedingungen oder dem Einfluss anti-inflammatorischer Zytokine, z.B. IL-10, werden die T-Zellen anerg oder regulatorisch [171, 23]. Dies kann der Fall sein, wenn DC infolge schwacher Aktivierungssignale oder unter dem Einfluss von IL-10 nicht vollständig ausgereift sind [152, 172] oder wenn die Zytokinproduktion in erschöpften DC zu einem späten Zeitpunkt nach deren Aktivierung nachlässt [173, 99].

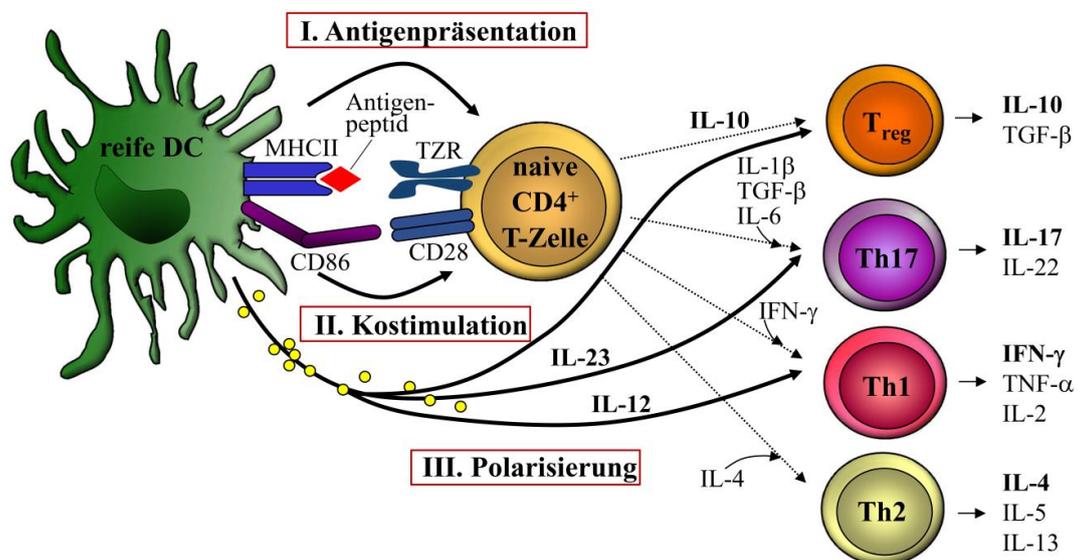


Abb. 1.1: Aktivierung und Polarisierung von naiven CD4⁺ T-Zellen durch DC (modifiziert nach [174])

Die Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen und deren Differenzierung in Effektorzellen erfordert verschiedene Signale: (I.) die Erkennung eines zum T-Zellrezeptor (TZR) passenden Antigens, das von der DC auf MHC-Klasse II-Molekülen präsentiert wird, (II.) kostimulatorische Signale über die Interaktion von CD86 oder CD80 auf der Oberfläche der DC mit CD28 auf Seiten der T-Zelle und (III.) polarisierende Zytokinsignale, die entweder von DC oder benachbarten Zellen stammen und die Entwicklung der selektierten Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in einen bestimmten T-Helferzell (Th)-Typ lenken. Anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 begünstigen dagegen die Differenzierung in regulatorische T-Zellen (T_{reg}).

Infolge der Differenzierung in bestimmte Effektor-Zelltypen regulieren die T-Zellen die Expression des Lymphknoten-*Homing*-vermittelnden Rezeptors CCR7 herunter [175] und wandern über efferente Lymphe und Blut in entzündete Gewebe ein [176]. Dabei bestimmt die anatomische Lokalisation des Lymphknotens, in dem die Aktivierung der Antigen-spezifischen T-Zelle durch den Kontakt mit der DC erfolgt, über den Gewebetropismus der aus dieser Begegnung hervorgehenden Effektor-/Gedächtnis-T-Zelle [176, 177]. Naive T-Lymphozyten, die in einem Lymphknoten in der Haut aktiviert werden, regulieren unter dem Einfluss von Vitamin D₃ die Expression der *Homing*-vermittelnden Moleküle CCR4, CCR10 und CLA (*cutaneous lymphocyte antigen*) hoch, die ein Zurückwandern in die Haut begünstigen [178, 179, 180]. In intestinalen Lymphknoten aktivierte T-Lymphozyten exprimieren hingegen Integrin $\alpha_4\beta_7$ (Tab. 1.4) und CCR9 und wandern in den Darm ein, wo die korrespondierenden Liganden MadCAM (*mucosal vascular addressin cell adhesion molecule*) und CCL25 (TECK, *thymus-expressed chemokine*) von intestinalen Endothel- und Epithelzellen exprimiert werden [177, 181, 182]. Für die Induktion des Darm-*Homings* ist Vitamin A (Retinol) erforderlich, das von DC in Retinolsäure umgewandelt wird [183].

1.2 T-Zell-vermittelte Immunität und Toleranz

1.2.1 T-Helferzellen

Die von den DC je nach Art des infizierenden Pathogens bereitgestellten Signale führen in den CD4⁺ T-Zellen zur Expression charakteristischer Transkriptionsfaktoren (Th1: T-bet, Th2: GATA-3 oder Th17: ROR- γ t), die den benötigten Th-Typ festlegen [184] (Abb. 1.1). Jeder Th-Typ zeichnet sich durch die Sekretion bestimmter Zytokine aus, die mit entsprechenden Funktionen assoziiert sind [19].

Die Th1-Zellen produzieren IFN- γ , das in Makrophagen die Phagosomenreifung und Mechanismen zur Abtötung intrazellulärer Pathogene, wie die Bildung reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffspezies, verstärkt [185], Aktivierungssignale für zytotoxische CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen liefert [186] und die Antikörper-Produktion (IgM, IgA, IgG₁, IgG₂, IgG₃) in B-Lymphozyten stimuliert [19]. Folglich sind Th1-Antworten entscheidend für die Beseitigung von intrazellulären Bakterien und Viren [184].

Dagegen produzieren Th2-polarisierte CD4⁺ T-Zellen IL-4, IL-13 und IL-5 [165] und sind für die Eliminierung extrazellulärer Parasiten und die Antikörper-Produktion (IgM, IgG₄, IgE) der B-Lymphozyten von Bedeutung [19].

Th17-Zellen sekretieren u.a. IL-17A, IL-17F und IL-22 [168], die bei der Abwehr gegen Pilze [187] und extrazelluläre Bakterien und bei der Bildung der mukosalen Barriere eine entscheidende Rolle spielen [188]. Neben IL-17A- und IL-17F-Homodimeren können auch IL-17A/F-Heterodimere gebildet werden, wobei das IL-17A Homodimer die stärkste pleiotrope Wirkung zeigt [188]. In Epithelzellen induziert IL-17 die Freisetzung antimikrobieller Peptide [168] und die Sekretion von Chemokinen, die neutrophile Granulozyten ins Gewebe rekrutieren [188].

Die einzelnen Th-Typen zeigen jedoch auch eine gewisse Flexibilität in ihrer Zytokinproduktion, die zu Beginn der Differenzierung die Möglichkeit bietet, auf Milieu-Veränderungen mit der Ausbildung eines anderen Th-Typs zu reagieren [189, 190, 191]. Je nach Aktivierungsstatus sind alle Th-Typen in der Lage, IL-10 zu produzieren [192, 184].

1.2.2 T-Zellgedächtnis und Homöostase

Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen sind durch den Kontakt mit dem Antigen und der DC geprägt [11]. Daher besitzen sie andere Voraussetzung für die Aktivierung als naive T-Zellen und können differenzierte Funktionen ausüben. Im Gegensatz zu naiven T-Zellen sind bei Effektor-/Gedächtniszellen die T-Zellrezeptoren effizient mit Signaltransduktionswegen verknüpft, so dass bereits bei einer geringen Antigen dosis eine schnelle Antwort erfolgen kann - auch in Abwesenheit kostimulatorischer Signale [160].

Anhand der differenziellen Expression der Protein-Tyrosin-Phosphatase (CD45)-Isoformen CD45RA und CD45RO (Tab. 1.4) lassen sich naive ($CD45RA^+ CD45RO^-$) und Effektor-/Gedächtniszellen ($CD45RA^- CD45RO^+$) phänotypisch unterscheiden [175, 193].

Die naiven $CD4^+$ T-Zellen zirkulieren im Blut und durch die lymphatischen Organe, bis sie auf das zu ihrem T-Zellrezeptor passende Antigenpeptid treffen und infolge der Aktivierung zu Effektorzellen differenzieren. Naive T-Zellen umfassen zwei Subpopulationen: zum einen kürzlich aus dem Thymus emigrierte, Thymus-naive T-Zellen (RTE, *recent thymic emigrants*) und zum anderen zentral-naive T-Zellen, die bereits in der Peripherie proliferiert haben [194] (Tab. 1.3). Die Anzahl der RTE ist direkt mit der Thymusfunktion assoziiert [195, 196] und nimmt in gesunden Menschen parallel zur Thymusleistung mit zunehmendem Alter kontinuierlich ab, wohingegen die zentral-naiven T-Zellen in der Peripherie stärker proliferieren, um den Pool der naiven T-Zellen aufrechtzuerhalten [197, 198]. Für die Identifizierung der RTE-Population im Blut existieren verschiedene Marker, die in der Literatur kontrovers diskutiert werden [199, 197, 196]. Beispielsweise ist der Anteil von RTE an der naiven T-Zellpopulation über den Gehalt sog. TREC (*T cell receptor excision circles*) abschätzbar [194]. Dabei handelt es sich um stabile ringförmige DNA-Abschnitte, die während der Reifung der T-Zellen im Thymus als Nebenprodukt der Umlagerung von T-Zellrezeptor-Gensegmenten entstehen und bei einer Zellteilung nicht repliziert werden [199]. Innerhalb der naiven $CD4^+$ T-Zellen weist die $CD31$ (PECAM-1, *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*; Tab. 1.4) exprimierende Subpopulation den höchsten TREC-Gehalt auf und nimmt mit zunehmendem Lebensalter übereinstimmend mit der Thymusleistung kontinuierlich ab [199, 200]. Daher hat sich $CD31$, das je nach Interaktionspartner die Adhäsion, Migration oder T-Zellrezeptor-vermittelte Aktivierung der T-Zellen regulieren kann [194], als Marker zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Frequenz von $CD4^+$ RTE im peripheren Blut durchgesetzt [197, 195]. Eine jüngst erschienene Arbeit von den Braber und Kollegen weist jedoch darauf hin, dass ein Teil der $CD31^+$ naiven $CD4^+$ T-Zellen

bereits proliferiert hat und damit nicht zu den RTE gehört [196]. Aus diesem Grund werden CD31⁺ naive CD4⁺ T-Zellen in der vorliegenden Arbeit als überwiegend Thymus-naive Subpopulation, in der RTE angereichert sind, betrachtet.

Die Gedächtnis-T-Zellen bestehen ebenfalls aus zwei Subpopulationen: zum einen den Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}, *effector memory T cells*), welche unmittelbar in den peripheren Geweben Effektorfunktionen ausführen und zum anderen den zentralen Gedächtniszellen (T_{CM}, *central memory T cells*), welche keine Effektormoleküle, dafür aber *Homing*-Moleküle für lymphatische Gewebe (CCR7 und CD62L) exprimieren [175] (Tab. 1.3). Die T_{CM} können im Lymphknoten DC aktivieren und so sekundäre Immunantworten anstoßen, auch wenn die DC nur ein schwaches stimulatorisches Potenzial besitzen [160]. Zudem sind T_{CM} fähig, nach dem wiederholten Kontakt mit demselben Antigen in T_{EM} zu differenzieren und in die betroffenen Gewebe einzuwandern [11]. Im Gegensatz zu terminal differenzierten Effektor-T-Zellen (T_{EMRA}, *terminally differentiated effector memory CD45RA⁺ cells*; Kap. 1.2.4), die nach der Eliminierung des Pathogens rasch zugrunde gehen [11], können die Antigen-spezifischen Gedächtniszellen (T_{CM} und T_{EM}) *in vivo* bis zu zehn Jahre überdauern [175]. Dabei behalten sie nicht nur ihr Gedächtnis für die zu produzierenden Zytokine, sondern auch für den Ort, an dem die Effektor-Funktion benötigt wird [184].

Tab. 1.3: Einteilung in CD4⁺ T-Zellsubpopulationen anhand des Effektorstatus (nach [175, 193, 194])

<i>Subpopulation</i>	<i>Phänotyp</i>	<i>Lebensdauer</i>	<i>Lokalisation</i>	<i>Effektormoleküle</i>
naiv	CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	langlebig	Blutzirkulation, gelangen über	keine
Thymus-naiv	CD31 ⁺		HEV in sekundäre	
zentral-naiv	CD31 ⁻		lymphatische Organe	
CM	CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	langlebig	Blutzirkulation, sekundäre lymphatische Organe	keine, aber rasche Differenzierung in EM
EM	CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	langlebig	Blutzirkulation, periphere nicht-lymphatische Gewebe	Zytokine
EMRA	CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	kurzlebig	entzündliche Gewebe	Zytokine

CM, *central memory*; EM, *effector memory*; EMRA, *terminally differentiated effector memory CD45RA⁺*; HEV, Hochendothelvenolen.

1.2.3 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische CD4⁺ T-Zellen (T_{reg}) sind entscheidend für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und die Kontrolle von Immunreaktionen [201]. Sie supprimieren die Aktivierung, Proliferation und Effektor-Funktion, insbesondere die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, in verschiedenen Immunzellen, wie Antigen präsentierenden Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, Phagozyten, NK- und NKT-Zellen [202].

Bereits in den 1970er Jahren wurden im Thymus von Mäusen Suppressorzellen beschrieben, die Toleranz induzieren [203]. Basierend auf der Entdeckung, dass murine T_{reg} durch die konstitutive

Expression der α -Kette des hochaffinen IL-2-Rezeptors (CD25; Tab. 1.4) gekennzeichnet sind [204], wurden $CD25^+ CD4^+ T_{reg}$ im Jahr 2001 erstmals auch im Menschen charakterisiert [205]. Für die regulatorische Funktion der T_{reg} ist die Expression des Transkriptionsfaktors *Forkhead-box-protein* (FOXP3) (Tab. 1.4) entscheidend [206]. Entsprechend induziert eine ektopische Expression von FOXP3 in naiven murinen $CD25^- CD4^+$ T-Zellen einen regulatorischen Phänotyp [207, 208]. Beim Menschen führen Mutationen im FOXP3-Gen zum IPEX (Immundysregulation-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X-chromosomales)–Syndrom, das aufgrund des Mangels an funktionellen T_{reg} schwere Autoimmunkrankheiten hervorruft [209, 202].

Im Blut von Gesunden beträgt der Anteil der $CD25^+ FOXP3^+ T_{reg}$ an $CD4^+$ T-Zellen etwa fünf Prozent [210]. Natürliche T_{reg} entwickeln sich im Thymus, wo autoreaktive unreife Thymozyten mit hoher T-Zellrezeptor-Affinität positiv selektiert werden und unter dem Einfluss von *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP)-aktivierten tolerogenen DC in T_{reg} differenzieren [211]. Ebenso wie die klassischen $CD4^+$ T-Zellen, treten T_{reg} nach dem Verlassen des Thymus in der Peripherie zunächst als naiv-ähnliche ($CD45RA^+$) ruhende T_{reg} auf, die FOXP3 gering exprimieren und nicht suppressiv sind [212, 213]. Die Aktivierung der T_{reg} scheint beständig durch die Erkennung von Selbstantigenen und exogenen Antigenen in peripheren Geweben zu erfolgen und führt zu einem Effektor-ähnlichen ($CD45RO^+$) Phänotyp der T_{reg} [214], verbunden mit einer hohen Expression von FOXP3, CD25 und *cytotoxic T-lymphocyte associated protein* (CTLA)-4 sowie einer starken suppressiven Aktivität [212, 213, 201]. Da aktivierte T_{reg} proliferieren und nach der Suppression rasch absterben, scheinen sie eher ein terminal differenziertes Stadium zu erreichen, anstatt eine langlebige Gedächtniszellpopulation zu bilden [213, 215]. Mit der Abnahme der Thymusfunktion im Alter verschiebt sich die T_{reg} -Population in Richtung Effektor-artiger T_{reg} [212, 213].

Neben der Differenzierung aus ruhenden, dem Thymus entstammenden T_{reg} , können sich $FOXP3^+$ Effektor- T_{reg} im Gewebe auch aus nicht-regulatorischen $CD4^+$ T-Zellen entwickeln [215]. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass T_{reg} unter homöostatischen Bedingungen durch tolerogene DC und die Anwesenheit von TGF- β und Retinolsäure in mesenterialen Lymphknoten und im lymphatischen Gewebe der Darmmukosa (GALT, *gut associated lymphoid tissue*) induziert werden und Toleranz gegenüber oral aufgenommenen (Nahrungs-) Antigenen vermitteln [216, 217, 218]. Allgemein scheinen, neben einer starken Stimulation des T-Zellrezeptors [219, 220], insbesondere die Zytokine TGF- β und IL-2 für die Induktion von T_{reg} aus naiven $CD4^+$ T-Zellen entscheidend zu sein, sowohl im Mausmodell [221, 222] als auch im Menschen [223, 224]. Die induzierten T_{reg} unterscheiden sich phänotypisch und funktionell kaum von den natürlichen T_{reg} , besitzen jedoch ein anderes T-Zellrezeptor-Repertoire und folglich eine andere Antigen-Spezifität [215, 225].

Anders als im Mausmodell bilden $CD25^+$ und $FOXP3^+ CD4^+$ T-Zellen im Menschen eine heterogene Population, die vorwiegend, aber nicht nur T_{reg} umfasst [201]. Denn auch nicht-regulatorische humane $CD4^+$ T-Zellen exprimieren nach der Aktivierung transient CD25 und FOXP3 (wenngleich weniger stark), ohne suppressiv zu wirken [226]. Die stabile und funktionelle Expression von FOXP3 erfordert

jedoch eine Demethylierung des *FOXP3*-DNA-Lokus, welche ausschließlich in T_{reg} vorzufinden ist [227]. Darüber hinaus existieren auch $FOXP3^+$ T-Zellpopulationen mit regulatorischer Aktivität, welche durch die Sekretion von IL-10 (Tr1, *T regulatory 1-like cells*) [171, 228] oder TGF- β (Th3, Th Typ 3) [229] gekennzeichnet sind.

Die Suppressorfunktion der T_{reg} umfasst zum einen Zellkontakt-abhängige und zum anderen Zytokin-vermittelte Mechanismen [201] (Abb. 1.2). In den Lymphknoten verhindern T_{reg} stabile Kontakte zwischen DC und naiven $CD4^+$ T-Zellen [230], indem sie durch LFA-1-vermittelte Adhäsionsmechanismen um DC aggregieren und somit naive T-Zellen verdrängen [231]. Über die Sekretion von TGF- β und IL-10 induzieren T_{reg} in $CD4^+$ T-Zellen einen regulatorischen Phänotyp [221, 224] und supprimieren die Reifung und Funktion Antigen präsentierender Zellen [232, 233] (Abb. 1.2). Zusätzlich beeinträchtigen T_{reg} durch den kompetitiven Verbrauch des Wachstumsfaktors IL-2 die Expansion der $CD4^+$ Effektorzellen [234, 235] (Abb. 1.2). Die T_{reg} können aber auch über die Bindung von Fas-Ligand an den Rezeptor Fas (CD95) auf Monozyten und $CD8^+$ T-Zellen Apoptose induzieren [236, 237] oder durch die Freisetzung der zytotoxischen Moleküle Granzym A und Perforin T-Zellen, Monozyten und DC lysieren [238].

Für die Zellkontakt-vermittelte Suppression ist der inhibitorische Rezeptor CTLA-4 (Tab. 1.4) besonders wichtig [239] (Abb. 1.2). Dieser wird von T_{reg} - im Gegensatz zu aktivierten T-Zellen - konstitutiv und maximal exprimiert und bindet mit einer höheren Affinität an die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 als der aktivierende Rezeptor CD28 [240]. Die Bindung von CTLA-4 führt zu einer Herunterregulierung von CD86 und CD80 auf Antigen präsentierenden Zellen und reduziert so deren kostimulatorisches Potenzial [239, 240]. In DC induziert die Bindung von CTLA-4 an CD86/CD80 zudem die Expression des Enzyms Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO), das die essenzielle Aminosäure Tryptophan in Kynurenin degradiert und damit die Proteinsynthese in den T-Zellen hemmt [241, 242]. Andererseits interagiert CTLA-4 auch mit CD80 auf Effektor-T-Zellen und supprimiert somit direkt deren Aktivierung [243].

Darüber hinaus sind T_{reg} in der Lage, pro-inflammatorische Effekte von extrazellulärem ATP [244, 245], das z.B. bei der Zerstörung von Zellen freigesetzt wird, durch dessen Abbau in regulatorisch wirkendes Adenosin [246] zu unterbinden (Abb. 1.2). Hierfür besitzen T_{reg} zwei Ektoenzyme: CD39 (Nucleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase-1, NTPDase; Tab. 1.4), das ATP in ADP oder AMP hydrolysiert und CD73 (5'-Ribonucleotid-Phosphohydrolase, NT5E), das AMP zu Adenosin abbaut [247, 248, 249]. Adenosin inhibiert in DC die Produktion von IL-12 und TNF- α und erhöht die Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 [250].

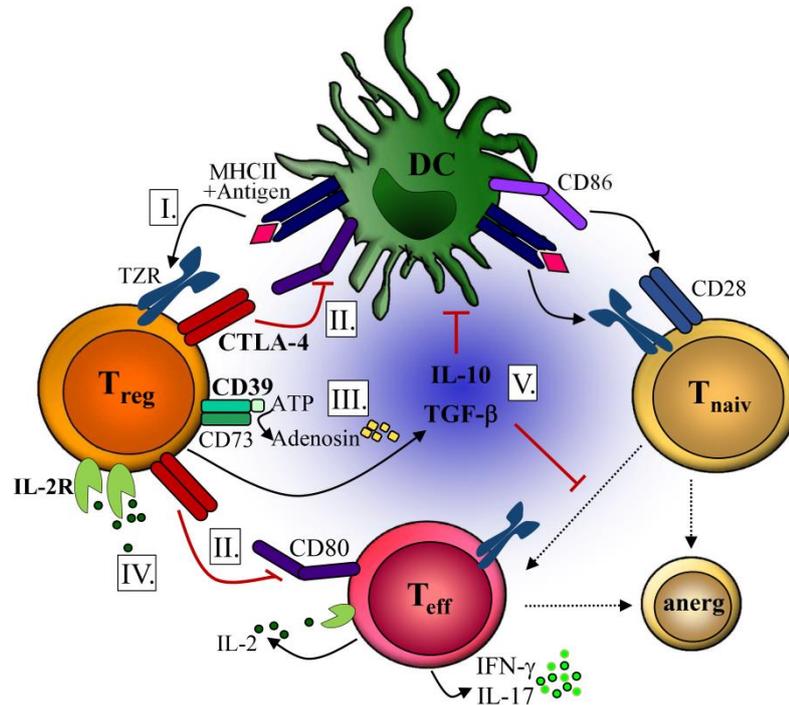


Abb. 1.2: Zellkontakt-abhängige und Zytokin-vermittelte Regulationsmechanismen der T_{reg}

Ruhende T_{reg} werden über T-Zellrezeptor (TZR)-Signale aktiviert (I.). Durch die Bindung des Rezeptors CTLA-4 an CD80 werden inhibitorische Signale vermittelt, welche zum einen die Herunterregulierung der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 in Antigen präsentierenden Zellen induzieren und zum anderen die Aktivität der Effektor-T-Zellen (T_{eff}) supprimieren (II.). Mit Hilfe der Ektonukleotidasen CD39 und CD73 wandeln T_{reg} ATP in AMP und Adenosin um, das regulatorische Effekte auf verschiedene Immunzellen ausübt (III.). Durch den kompetitiven Verbrauch des Wachstumsfaktors IL-2 kontrollieren die T_{reg} zudem die Expansion der Effektor-T-Zellen (IV.). Die von den T_{reg} sekretierten regulatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β verhindern die Ausreifung von DC und damit die Aktivierung naiver T-Zellen (V.). Schließlich führen die inadäquate Stimulation durch Antigen präsentierende Zellen und der Einfluss löslicher und Zellkontakt-abhängiger Suppressionsmechanismen der T_{reg} dazu, dass die Effektor-T-Zellen anerg werden oder selbst regulatorische Zytokine produzieren.

1.2.4 T-Zell-Anergie und Erschöpfung

Die T-Zell-Anergie ist ein wichtiger Toleranzmechanismus des Immunsystems, der Entzündungsreaktionen gegen körpereigene oder harmlose Antigene verhindert [53, 251, 252]. Der Begriff „Anergie“ wurde 1908 von Clemens von Pirquet geprägt, um den Verlust der Hautreaktion gegenüber dem *Recall*-Antigen Tuberkulin in Individuen mit einer Masern-Infektion zu beschreiben [253]. Heute bezeichnet Anergie einen funktionell inaktivierten Zustand von T-Zellen, in welchem sie nicht mehr in der Lage sind, auf eine erneute Stimulation zu reagieren [254]. Nach dem wiederholten Kontakt mit dem spezifischen Antigen oder der Stimulation mit Superantigenen proliferieren anergische $CD4^+$ T-Zellen nicht und sekretieren weder IL-2 noch inflammatorische Zytokine wie TNF- α und IFN- γ [254, 251]. Eine derartige Hyporesponsivität ist auch für chronische Infektionen typisch und kann durch die Beseitigung der persistierenden Antigene teilweise aufgehoben werden [254].

Anergie wird induziert, wenn die Aktivierung der naiven T-Zellen unter suboptimalen Bedingungen erfolgt [254]. Dazu gehören eine schwache oder fehlende Kostimulation [255], starke inhibitorische Signale, beispielsweise über CTLA-4 [128] und *programmed death* (PD)-1 [256] oder eine niedrige Avidität der T-Zellrezeptor-Liganden bei Anwesenheit kostimulatorischer Signale [257]. Unter optimalen Aktivierungsbedingungen kann auch der Einfluss der regulatorischen Zytokine IL-10 oder TGF- β , welche von T_{reg} oder DC bereitgestellt werden, Anergie auslösen [258, 224, 259]. Ebenso können T_{reg} die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen oder deren Effektorfunktion über Zellkontakt-abhängige Mechanismen, direkt oder indirekt (über die Verringerung des stimulatorischen Potenzials Antigen präsentierender Zellen) supprimieren (Kap. 1.2.3; Abb. 1.2).

Einen Schutz vor inhibitorischen Signalen liefert die Expression des kostimulatorischen Rezeptors *Glucocorticoid-induced TNF receptor family related gene* (GITR; Tab. 1.4) [260, 261]. Die Ligation von GITR-Ligand auf Antigen präsentierenden Zellen an GITR auf gerade aktivierten CD4⁺ T-Zellen fördert deren Überleben, stimuliert die Proliferation [262] und reduziert die Anfälligkeit für die T_{reg}-vermittelte Suppression [263]. Auch T_{reg} exprimieren GITR [264] und expandieren infolge der Bindung von GITR-Ligand, wodurch sie, zeitlich versetzt, zur Beendigung der Immunantwort beitragen [262].

In einer chronischen Umgebung oder im Anschluss an eine Immunantwort greift ein weiterer spezifischer Toleranzmechanismus: die T-Zell-Erschöpfung [265] bzw. der Aktivierungs-induzierte Zelltod (AICD, *activation induced cell death*) [266]. Nach einer starken Antigen-spezifischen Aktivierung oder einer wiederholten Stimulation durch einen persistierenden Erreger exprimieren T-Zellen inhibitorische Rezeptoren wie CTLA-4 [128], PD-1 [256] und CD95 [267], deren Bindung zu einer Inaktivierung führt oder Apoptose auslöst [268, 131, 269] (Tab. 1.4). Somit können Immunantworten nach der Beseitigung des Pathogens wieder abgeschaltet werden, um eine Gewebeerstörung infolge pathologischer Entzündungsreaktionen zu vermeiden [270, 271].

Die Ligation von CTLA-4 und PD-1 inhibiert T-Zellrezeptorsignale sowie die Proliferation und Zytokinproduktion der T-Zellen [268, 131]. Während die Interaktion von CD86/CD80 auf Antigen präsentierenden Zellen mit CTLA-4 auf T-Zellen bereits im Lymphknoten Toleranz induziert, spielt PD-1 vor allem bei der Langzeit-Aufrechterhaltung der Toleranz im Gewebe eine wichtige Rolle [270]. Die PD-1 Expression erreicht in aktivierten T-Zellen erst drei Tage nach der Aktivierung ihr Maximum und bleibt, im Gegensatz zur Expression von CTLA-4 bestehen [272]. Der korrespondierende Ligand für PD-1 ist PD-L1 [131, 273], welcher konstitutiv in verschiedenen Geweben, u.a. auf T-Zellen, Antigen präsentierenden Zellen und T_{reg}, vorhanden ist und durch inflammatorische Zytokine hochreguliert wird [132, 274, 275].

Die terminale Differenzierung bzw. Erschöpfung Antigen-spezifischer T-Zellen führt in der Kontraktionsphase der Immunantwort zu deren klonalen Deletion [271]. Hierbei bindet Fas-Ligand, der von den T-Zellen selbst oder anderen Zelltypen, z.B. Epithelzellen, unter dem Einfluss von TNF- α

induziert wird, in löslicher oder Membran-gebundener Form an den Rezeptor CD95 auf aktivierten Effektor-T-Zellen und vermittelt Apoptose-Signale [276, 277].

Tab. 1.4: Marker zur phänotypischen und funktionellen Charakterisierung von T-Zellen

<i>Antigen</i>	<i>Synonym</i>	<i>Funktion</i>	<i>T-Zell-Subpopulation</i>	<i>Referenzen</i>
Klassifizierung nach Aktivierungsgrad				
CD45RA	LCA, PTP	lange Isoform; Beteiligung an Signalübertragung nach T-Zellrezeptor-Aktivierung, kontrolliert Schwellenwert der Aktivierung	naive T-Zellen, T _{EMRA}	[278, 175]
CD45RO	LCA, PTP	kurze Isoform; Beteiligung an Signalübertragung nach T-Zellrezeptor-Aktivierung, kontrolliert Schwellenwert der Aktivierung	Effektor-/Gedächtniszellen	[278, 175]
CD31	PECAM-1	Migration, Integrin-Aktivierung, Regulation der T-Zellrezeptor-vermittelten Aktivierung	naive RTE-reiche T-Zellen	[199, 279]
CCR7	CD197, EBI1	Migration in T-Zell-Areale der Lymphknoten entlang Gradienten von CCL19 oder CCL21	naive T-Zellen, T _{CM}	[175, 156]
Migration in den Darm				
Integrin β 7		Einwanderung in den Darm über Bindung an MAdCAM-1	T-Zellen mit Darmtropismus	[280, 176]
Aktivierung				
CD40L	CD154	Ligand für CD40; Kostimulation Antigen präsentierender Zellen	aktivierte T-Zellen	[126, 162]
CD69	AIM, EA1	transiente Induktion kurz nach T-Zellrezeptor-vermittelter Aktivierung; Immunmodulation	aktivierte T-Zellen	[281, 282]
CD25	IL2-R α	Untereinheit des hoch affinen IL-2-Rezeptors (CD25/CD122/CD132); Proliferation und Induktion der Zytokinproduktion	aktivierte T-Zellen, T _{reg}	[161, 204, 205]
GITR	TNFRSF18AITR	Rezeptor für GITR-Ligand; Stimulation der Proliferation, vermittelt Unempfindlichkeit gegenüber Suppression	aktivierte T-Zellen, T _{reg}	[260, 263, 262]
Regulatorische Funktion				
FOXP3*	Scurfin	Transkriptionsfaktor, induziert regulatorische Funktion	T _{reg}	[207, 208, 206]
CD39	NTPDase	Ektonukleotidase; katalysiert Hydrolyse von ATP zu ADP und AMP	T _{reg} , Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen	[247, 248]
CTLA-4	CD152	CD28-Familie, Interaktion mit CD80/CD86, Zellkontakt-vermittelte Suppression; induziert Herunterregulierung von CD80/CD86	aktivierte T-Zellen, T _{reg}	[268, 239]
Erschöpfung/Anergie				
PD-1	CD279	Rezeptor für PD-L1 und PD-L2; Inhibition von Proliferation und Produktion inflammatorischer Zytokine	erschöpfte T-Zellen	[275, 256]
Fas	CD95	Apoptose-vermittelnder Rezeptor	Apoptose-sensitive Zellen	[276, 271]

AIM, activation induced molecule; AITR, activation-inducible TNFR-family receptor; CCR, CC-Motiv Chemokinrezeptor; CTLA-4, cytotoxic T lymphocyte antigen 4; EA1, early activation antigen 1; EBI1, *Epstein-Barr virus-induced molecule 1*; FOXP3, Forkhead-box-protein 3; GITR, glucocorticoid-induced TNFR-related protein; LCA, leukocyte common antigen; MAdCAM-1, mucosal vascular adressin cell adhesion molecule 1; NTPDase, Nucleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase-1; PECAM-1, *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*; PD-1, programmed death 1; PTP, Protein-Tyrosin-Phosphatase; RTE, recent thymic emigrants; *intranukleäre Expression.

Die verschiedenen Mechanismen der peripheren Toleranz - T-Zell-Anergie, Erschöpfung und Regulation - verhindern unerwünschte Immunreaktionen und tragen zur Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase bei [53, 23, 269]. Doch im Laufe der Koevolution haben sich verschiedene pathogene Mikroorganismen diese Mechanismen zunutze gemacht, um der Immunabwehr ihres Wirts zu entgehen [283, 284, 285, 286].

1.3 Morbus Whipple – eine seltene chronische Infektionskrankheit

1.3.1 Epidemiologie und klinisches Erscheinungsbild des Morbus Whipple

Morbus Whipple (MW) ist eine seltene chronische Multisystemerkrankung [287], die auf das Umweltbakterium *Tropheryma (T.) whipplei* [288] zurückzuführen ist und sich hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt, in den Gelenken und im Zentralnervensystem (ZNS) manifestiert [289, 290].

Die Krankheit wurde erstmals 1907 von dem Pathologen George Hoyt Whipple beschrieben und aufgrund der in Darmmukosa und mesenterialen Lymphknoten entdeckten Fettablagerungen als „intestinale Lipodystrophie“ bezeichnet [291]. Whipple`s Vermutung, die Krankheit sei bakteriellen Ursprungs [291], bestätigte sich durch den Nachweis stäbchenförmiger Bakterien mittels Elektronenmikroskopie (Abb. 1.3B) im Jahr 1961 [292, 293]. Die Amplifizierung und Sequenzierung der 16 S ribosomalen (r) RNA des noch unbekanntes Bakteriums Anfang der 1990er Jahre [294, 295] führte zur Identifizierung einer neuen Bakterien-Spezies, die zunächst den Namen „*Tropheryma whippelii*“ erhielt und nach erfolgreicher Kultivierung [296] und Charakterisierung in „*Tropheryma whipplei*“ umbenannt wurde [297].

An der chronischen Infektion mit *T. whipplei* erkranken bevorzugt Männer (85 %) europäischer Abstammung im mittleren Alter (ca. 55 Jahre zum Diagnosezeitpunkt) [287]. Generell kann die Krankheit jedes Organsystem betreffen [298] und entwickelt sich schleichend über Jahre hinweg [299]. Bei 63 % der MW-Patienten gehen Gelenkbeschwerden dem ersten Auftreten gastrointestinaler Symptome um mehrere Jahre voraus [300, 301]. Zu den häufigsten Symptomen des MW zählen neben Gelenkschmerzen oder Arthritis (80 %), Gewichtsabnahme (90 %), Durchfall (80 %), krampfartige Bauchschmerzen (45 %), Hypoalbuminämie (90 %), Anämie (80 %), Lymphknotenschwellung (55 %), Hautpigmentation (40 %) und Fieber (35 %) [287]. Bei 30 % der MW-Patienten manifestiert sich die Infektion zudem im ZNS und kann zu irreversiblen neurologischen Beeinträchtigungen wie Augenmuskellähmung, Demenz, Depressionen, Verwirrung oder Persönlichkeitsveränderungen führen [289, 302]. Etwa 15 % der MW-Patienten zeigen keine klassischen MW-Symptome [301], sondern eine isolierte lokale Manifestation der Erkrankung in Gelenken [300], ZNS [302] oder in Form einer infektiösen Herzklappenentzündung [303, 304].

Die Inzidenz für MW ist mit 1/1.000.000 (Neuerkrankungen/Einwohner im Jahr) sehr gering [289]. Da MW auch im familiären Kontext auftritt [305, 306] und mit den humanen Leukozyten-Antigen (HLA)-Allelen DRB1*13 und DBQ1*06 assoziiert ist [307], scheinen genetische Komponenten für einen chronischen Verlauf der *T. whipplei*-Infektion zu prädisponieren.

Die Diagnose des MW ist aufgrund des breiten Symptomspektrums und der Ähnlichkeit zu anderen Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis, Sarkoidose, Tumoren oder mykobakteriellen Infektionen schwierig und erfolgt oft verspätet [299]. Bei einer Endoskopie präsentiert sich die Schleimhaut im Zwölffingerdarm (Duodenum) der MW-Patienten meist unauffällig, seltener sind blass-gelbe wulstige Schwellungen erkennbar [299]. In einigen Fällen zeigt die histologische Untersuchung abgeflachte Villi und erweiterte Lymphgefäße [287].

Gold-Standard zur Diagnose des MW ist der 1949 etablierte histologische Nachweis Perjodsäure-Schiff'sches-Reagenz (PAS, *Periodic acid-Schiff*)-positiver Makrophagen [308] in Biopsien aus dem Duodenum (Abb. 1.3A) oder anderen betroffenen Organen wie Magen, Dickdarm, Synovialmembran, Lymphknoten, Haut und Gehirn [289]. Weitaus sensitiver als die PAS-Reaktion ist der immunhistochemische Nachweis von *T. whipplei* in Geweben mittels spezifischer Antikörper (Abb. 1.3D), welche lebende und tote *T. whipplei* sowohl intrazellulär als auch extrazellulär erkennen [298]. Metabolisch aktive Bakterien lassen sich aber auch mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) anhand ihrer 16 S rRNA detektieren (Abb. 1.3C) [309].

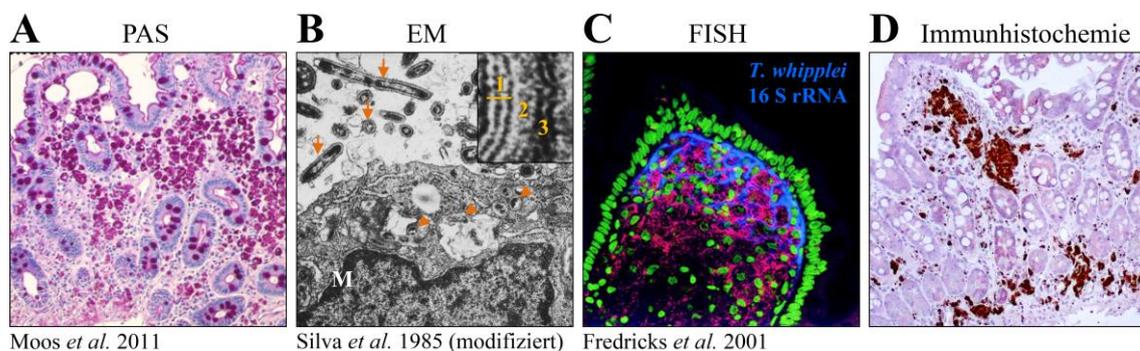


Abb. 1.3: Verschiedene Verfahren zum Nachweis von *T. whipplei* in Geweben [287, 310, 309]

Die Fotos zeigen Duodenalbiopsien unbehandelter MW-Patienten. A: Perjodsäure-Schiff'sches Reagenz (PAS, *Periodic acid-Schiff*) detektiert Kohlenhydrat-haltige Komponenten wie Glykoproteine und abgebaute Zellwandbestandteile von *T. whipplei*, aber auch saure Mukopolysaccharide in Becherzellen und Brunner'schen Drüsen. B: Im Elektronenmikroskop (EM) sind einzelne Bakterien extrazellulär (Pfeile) und innerhalb von Makrophagen (M; Pfeilspitzen) erkennbar. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt den charakteristischen Aufbau der Zellwand von *T. whipplei*, die aus einer dreischichtigen Zytoplasmamembran (1) besteht, welche von einer dicken Zellwand aus Peptidoglykan (2) umgeben und von einer äußeren symmetrischen Membran (3) umschlossen wird. C: Mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurden metabolisch aktive Bakterien anhand ihrer 16 S rRNA (blau) an der Vilusspitze detektiert. Die Zellkerne sind grün dargestellt; D: Mit Hilfe spezifischer Antikörper können lebende und tote *T. wipplei* immunhistochemisch nachgewiesen werden.

In der Regel wird die Diagnose durch eine *T. whipplei*-spezifische Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) aus einer Probe des betroffenen Gewebes und eine anschließende Sequenzierung bestätigt [290]. Serologische Tests eignen sich nicht zur Diagnose des MW, da *T. whipplei*-spezifische Antikörper nicht nur bei MW-Patienten, sondern auch bei Gesunden und asymptomatischen Trägern im Serum vorhanden sind [296, 311].

Ohne Behandlung verläuft der MW meist tödlich [289]. Die Einführung der antibiotischen Therapie im Jahr 1952 legte den Grundstein für eine gute Prognose der Krankheit bei rechtzeitiger Erkennung und Behandlung [312]. In der Regel erhalten MW-Patienten eine zweiwöchige intravenöse Induktionstherapie mit einer hohen Dosis eines Liquor-gängigen Antibiotikums (Ceftriaxon, Meropenem, Penicillin G oder Chloramphenicol), gefolgt von einer zwölfmonatigen oralen Erhaltungstherapie mit Cotrim (Trimethoprim-Sulfamethoxazol) oder Tetracyclin [289]. Über 90 % der MW-Patienten sprechen gut auf die Antibiotika-Therapie an, wohingegen wiederkehrende Infektionen, sog. Rezidive, häufig bei einer neurologischen Beteiligung des MW auftreten und oftmals einen ungünstigen klinischen Verlauf zeigen [302, 301]. Etwa zehn Prozent der MW-Patienten entwickeln kurz nach Beginn oder im Verlauf der Therapie ein entzündliches Immunrestitutions-Syndrom (IRIS, *immune reconstitution inflammatory syndrome*), insbesondere dann, wenn vorher eine Behandlung mit Immunsuppressiva erfolgte [313]. In der Regel ist zum Zeitpunkt des Ausbruchs dieser überschießenden Immunreaktion keine *T. whipplei*-DNA mehr nachweisbar [313] und die typischen IRIS-Symptome wie Fieber, lokale Entzündungen, Ödembildung oder Endothelschäden können mit Corticosteroiden therapiert werden [289].

1.3.2 Der Erreger *Tropheryma whipplei*

Der Erreger des MW, *T. whipplei*, ist ein 0,2 x 2 µm großes stäbchenförmiges Bakterium [310] (Abb. 1.3B), das wie *Mycobacterium tuberculosis*, der Erreger der Tuberkulose, zu den grampositiven Aktinobakterien gehört [314]. Kennzeichnend für *T. whipplei* ist die dreischichtige Zytoplasmamembran, welche von einer dicken Zellwand aus Peptidoglykan mit einer ungewöhnlichen inneren Schicht aus Polysacchariden sowie einer äußeren symmetrischen Membran umschlossen wird [310].

Die Sequenzierung der Genome von zwei verschiedenen *T. whipplei*-Stämmen (TW08/27 und Twist^T) im Jahr 2003 lieferte wichtige Informationen über Lebensweise und Pathogenitätsmechanismen dieses Bakteriums [314, 315]. Das reduzierte Genom (< 1 Mb) mit einem im Vergleich zu Aktinomyceten verringerten Guanin/Cytosin-Gehalt von 46,3 % deutet auf die parasitische Lebensweise von *T. whipplei* hin [314, 316] und das Proteom ähnelt dem obligat intrazellulärer Pathogene [317]. Aufgrund des Fehlens essentieller Energiestoffwechsel- und Biosynthesewege [314, 315] und der Abhängigkeit von extern zugeführten Aminosäuren [318] scheint *T. whipplei* auf einen Wirt oder die

Symbiose mit anderen Mikroorganismen angewiesen zu sein [289]. Entsprechend besitzt *T. whipplei* Transportsysteme für den Import essentieller Verbindungen und Aminosäuren sowie den extrazellulären Transport von Polysacchariden [314]. Zudem ist *T. whipplei* das einzige Bakterium, dem die zur Aufrechterhaltung des intrazellulären Redoxgleichgewichts notwendigen Thioredoxin- und Glutaredoxin-Systeme fehlen [315].

Da *T. whipplei* im Gewebe sowohl extrazellulär als auch intrazellulär vorkommt (Abb. 1.3), ist von einer fakultativ intrazellulären Lebensweise auszugehen [310, 309]. Neben Makrophagen, den Hauptwirtszellen, wurde *T. whipplei* auch in einer Vielzahl anderer Zelltypen nachgewiesen, darunter intestinale Epithelzellen, kapillare und lymphatische Endothelzellen, Neutrophile, Lymphozyten, Mastzellen, glatte Muskelzellen und Plasmazellen [309, 319]. Das Vorkommen in Abwässern, insbesondere in ländlichen Gebieten [288, 320], die phylogenetische Nähe zu den Bodenbakterien [295] und die einzigartige Anpassungsfähigkeit an Temperaturstress [321] deuten darauf hin, dass es sich bei *T. whipplei* um einen ubiquitären Umweltkeim handelt. Eine Besonderheit von *T. whipplei* ist die Resistenz gegenüber dem zur Desinfektion und Konservierung verwendeten Glutaraldehyd [322]. Aus unterschiedlichen geographischen Regionen und biologischen Quellen isolierte *T. whipplei*-Stämme zeigten einen hohen Grad der Konservierung, weswegen angenommen wird, dass *T. whipplei* selten mit exogener DNA interagiert [323]. Die genetische Diversität von *T. whipplei* ist vor allem auf Variationen der Membranproteine zurückzuführen [323]. Jedoch konnte kein Zusammenhang zwischen bestimmten *T. whipplei*-Stämmen und deren Pathogenität oder den verschiedenen Manifestationen des MW festgestellt werden [324]. Mehrfachinfektionen sind sowohl mit dem gleichen als auch mit anderen Genotypen möglich [325] und dieselben *T. whipplei*-Stämme treten sowohl in gesunden Trägern als auch in MW-Patienten auf [324].

Erste Erfolge bei der Kultivierung von *T. whipplei* wurden in humanen Zellen erzielt [326, 296]. Raoult und Kollegen etablierten im Jahr 2000 eine permanent infizierte humane Fibroblasten-Zelllinie, indem sie *T. whipplei* (Stamm „Twist-Marseille^{Tc}“) aus der Herzklappe eines MW-Patienten isolierten und durch Zentrifugation auf den Zielzellen anreicherten [296]. Die Verdopplungszeit von *T. whipplei* betrug in dieser Kultur 18 Tage und war somit wesentlich länger als bei den meisten humanpathogenen Bakterien [296]. Ausgehend vom Bedarf an extern zugeführten Aminosäuren wurde im Jahr 2003 schließlich ein axenisches Medium zur Zell-freien Kultivierung entwickelt, mit dem sich die Verdopplungszeit von *T. whipplei* auf 28 Stunden verkürzte [318].

So wie andere humanpathogene Keime, besitzt auch *T. whipplei* spezielle Immunevasions-Mechanismen, die es ihm ermöglichen, dem Abwehrsystem seines Wirts zu entgehen [314, 315, 327]. Da das Genom von *T. whipplei* eine Vielzahl von Genen für die Biosynthese *T. whipplei*-spezifischer Zellwand- bzw. Membranproteine beherbergt, scheint die Interaktion mit dem Wirt eine wichtige Rolle zu spielen [314]. Die genetische Variabilität der Oberflächenproteine von *T. whipplei* wird durch nicht-kodierende repetitive DNA-Bereiche, die für Bakterien ungewöhnlich sind, und die Reduktion

von DNA-Reparatursystemen begünstigt [314, 315]. Entscheidend für die Pathogenität von *T. whipplei* ist auch die Glykosylierung der Oberflächenproteine [327]. Da *T. whipplei* nur wenige Kohlenhydrate selbst synthetisieren kann, nutzt das Bakterium dafür entsprechende Schlüsselenzyme und Kohlenhydrate der Wirtszelle [327]. Die Glykosylierung von *T. whipplei* führt zu einer Antigen-Maskierung und behindert damit die Antikörper-vermittelte Erkennung durch das Immunsystem. Zum anderen schützt sie *T. whipplei* als intrazellulärer Biofilm vor der bakteriziden Aktivität in Makrophagen [327].

1.3.3 Immunpathogenese des Morbus Whipple

Die Infektion mit *T. whipplei* ist ansteckend und wird wahrscheinlich von Mensch zu Mensch auf fäkal-oralem [320, 328] oder oral-oralem [329, 330] Weg übertragen (Abb. 1.4). Für eine fäkal-orale Route spricht, dass *T. whipplei* insbesondere in Stuhlproben von Personen auftritt, die unter schlechten hygienischen Bedingungen leben [331] oder ständigen Kontakt mit kontaminiertem Wasser haben [320, 332]. Mit der Isolation und Kultivierung von *T. whipplei* aus einer Speichelprobe wurde jedoch gezeigt, dass auch die Ansteckung über Speichel, insbesondere unter guten hygienischen Bedingungen, eine Rolle spielen könnte [329, 330].

Die Primärinfektion mit *T. whipplei* (Abb. 1.4) erfolgt oftmals bereits im Kleinkindalter und verläuft entweder asymptomatisch oder symptomatisch - in Form einer Gastroenteritis mit mildem Durchfall (15 % der Gastroenteritiden französischer Kinder) [333] oder einer Bakteriämie mit Fieber und Husten (6 % der Bevölkerung im ländlichen Senegal) [334]. Daneben wurde eine Beteiligung von *T. whipplei* auch bei drei Prozent der Lungenentzündungen entdeckt [335]. In der Regel ist die Primärinfektion selbst-limitierend (Abb. 1.4) und führt zu einer protektiven zellulären und humoralen Immunität gegen *T. whipplei* [336, 311, 333]. Entsprechend beträgt die Prävalenz *T. whipplei*-spezifischer Antikörper im Serum der erwachsenen Bevölkerung 45 % in Frankreich [333] bzw. 71 % im ländlichen Senegal [330] und eine *T. whipplei*-spezifische Th1-Reaktivität im Blut ist bei 80 % der gesunden Erwachsenen zu finden (unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe). Darüber hinaus wurde eine asymptomatische Trägerschaft von *T. whipplei* (Abb. 1.4) bei 4-12 % der gesunden Bevölkerung und 12-25 % der Klärwerksarbeiter in Europa sowie bei 31 % der Menschen im ländlichen Senegal festgestellt [320, 332, 330]. Trotz des Vorkommens von *T. whipplei* in der Umwelt [288] und der Häufigkeit akuter Infektionen [333, 334] und asymptomatischer Trägerschaft [332, 320], entwickelt nur ein geringer Anteil der Individuen einen klassischen MW oder eine chronische lokale Infektion (Abb. 1.4). Da MW-Patienten sonst immunkompetent sind und keine opportunistischen Infektionen zeigen, scheinen subtile immunologische Faktoren die Persistenz und systemische Ausbreitung von *T. whipplei* zu ermöglichen [287].

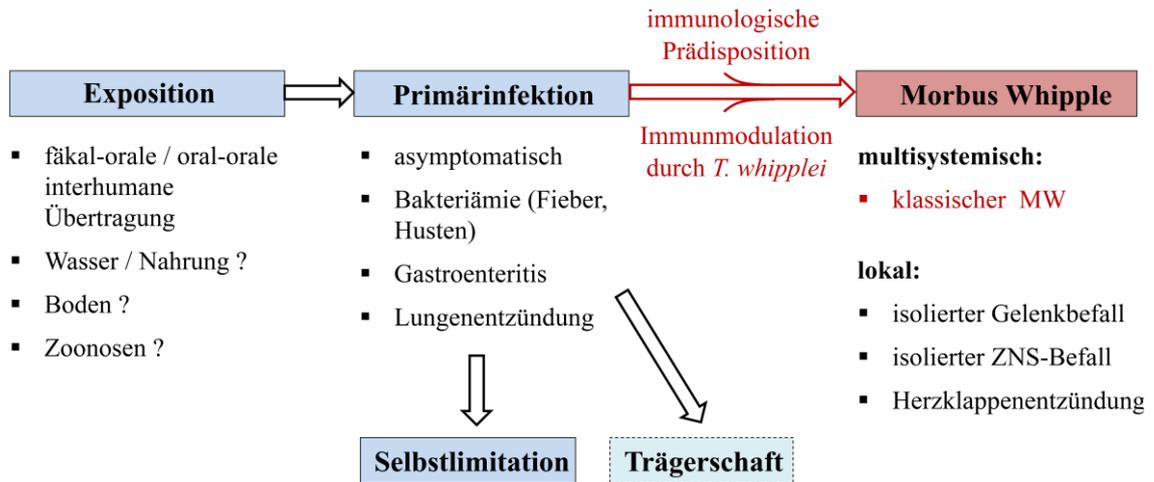


Abb. 1.4: Von der Infektion mit *T. whipplei* zur Entstehung des MW (modifiziert nach [337])

Infektionen mit *T. whipplei* werden von Mensch zu Mensch auf fäkal-oralem oder oral-oralem Weg übertragen. Die Primärinfektion verläuft entweder asymptomatisch oder tritt u.a. als Bakteriämie, Gastroenteritis oder Lungenentzündung in Erscheinung. In den meisten Fällen ist die akute *T. whipplei*-Infektion selbst-limitierend oder führt zu einer asymptomatischen Trägerschaft. In einzelnen Individuen fördern prädisponierende immunologische Faktoren die Persistenz von *T. whipplei* und ermöglichen es dem Bakterium, die Immunantwort zum Zweck seiner Replikation und Verbreitung zu modulieren. Je nach Ausprägung der chronischen *T. whipplei*-Infektion werden lokale Manifestationen und ein systemischer Befall unterschieden.

Nach der oralen Aufnahme besiedelt *T. whipplei* den Gastrointestinaltrakt, insbesondere den oberen Dünndarmabschnitt, das Duodenum, und wird dort nach dem Durchdringen der Epithelbarriere von Makrophagen der Lamina propria internalisiert [338]. Die intrazelluläre Replikation von *T. whipplei* führt zu einer massiven Akkumulation von Bakterien in den Makrophagen, so dass vergrößerte vakuolisierte Makrophagen schließlich die gesamte Lamina propria ausfüllen und die Nährstoffaufnahme behindern [338]. Aufgrund ihrer verringerten Beweglichkeit verstopfen die mit *T. whipplei*-gefüllten Makrophagen die afferenten Lymphgefäße und verursachen einen Lymphstau [339]. Die systemische Ausbreitung der Infektion erfolgt wahrscheinlich durch infizierte Monozyten, in denen *T. whipplei* über die Blutbahn auch in immunologisch privilegierte Organe wie Augen und ZNS gelangt [340].

Bisherige immunologische Untersuchungen konzentrierten sich vor allem auf Makrophagen, in denen sich *T. whipplei* bei MW-Patienten scheinbar ungehindert vermehrt [341, 338, 342, 343, 344]. Dabei stellte sich heraus, dass Makrophagen von MW-Patienten zwar *T. whipplei* aufnehmen, jedoch nicht in der Lage sind, die Bakterien zu eliminieren [345, 338]. So zeigen MW-Patienten im Duodenum eine reduzierte Nitrit-Produktion und in Blut-Monozyten eine verringerte Induktion reaktiver Sauerstoff-Intermediärprodukte in Reaktion auf *T. whipplei* im Vergleich zu Gesunden [338]. Marth und Kollegen postulierten, dass die reduzierte bakterizide Aktivität der Monozyten und Makrophagen mit der verringerten Expression der α -Kette des Komplementrezeptors 3 (CD11b; Tab. 1.2) auf mononukleären Zellen im Blut assoziiert sein könnte [346]. Mit *T. whipplei* infizierte Makrophagen

sekretieren IFN-Typ I, das zum einen die intrazelluläre Replikation von *T. whipplei* begünstigt und zum anderen Apoptose einleitet [342]. Die Induktion von Apoptose ist mit der Aktivierung der Effektor-Caspase 3 verbunden [344], die IL-16 aus der Pro-Form in die biologisch aktive Form spaltet [347, 348]. Folglich korreliert die Aktivität des MW auch mit einer systemisch erhöhten Konzentration an Nukleosomen, einem Indikator für Apoptose, und IL-16 [349]. Das Zytokin IL-16 inhibiert wiederum die Phagolysosomen-Bildung in den Makrophagen und ermöglicht damit das Überleben und die Vermehrung von *T. whipplei* im sauren Milieu der späten Endosomen [350, 343, 351]. Die Präsenz von *T. whipplei* induziert in Makrophagen aber auch eine Polarisierung in Richtung alternativ aktivierter, sog. M2-Makrophagen, deren Anzahl im Duodenum der MW-Patienten entsprechend erhöht ist [338, 341]. Dabei unterdrückt *T. whipplei* die IL-12-Expression und steigert die Expression von IL-10 und TGF- β - sowohl bei *in vitro* infizierten Monozyten und Makrophagen [351] als auch in der duodenalen Mukosa un behandelter MW-Patienten [338, 341, 352].

Trotz der massiven Besiedlung mit *T. whipplei* zeigen MW-Patienten keine Entzündungsreaktion im Darm [338]. Vielmehr ist die Anzahl der T-Lymphozyten bei MW-Patienten im Duodenum und im Blut reduziert [338, 346]. Zudem besitzen MW-Patienten eine verringerte Serumkonzentration von IL-12p40 [353] und eine systemisch verminderte Th1-Aktivität, wodurch Th2-Antworten begünstigt werden [354]. Die mit der Th2-Polarisierung assoziierten Zytokine IL-4 und IL-10 fördern das Überleben von *T. whipplei* in Makrophagen, wie die ersten Erfolge bei Kultivierung von *T. whipplei* in mittels IL-4 und IL-10 inaktivierten Monozyten zeigten [326]. Im Gegensatz zu Gesunden fehlt in MW-Patienten eine *T. whipplei*-spezifische Th1-Antwort im Darm und in der Peripherie - selbst nach der erfolgreichen Therapie [336].

Die reduzierte Th1-Reaktivität wirkt sich in MW-Patienten auch auf die Bildung *T. whipplei*-spezifischer Antikörper aus [355]. Entsprechend ist die Serumkonzentration von IgG₂, einer von IL-12 und IFN- γ abhängigen Antikörper-Subklasse, in MW-Patienten reduziert [355, 356]. Auch die im Vergleich zu asymptomatischen Trägern verringerte Sekretion *T. whipplei*-spezifischer IgG-Antikörper [311] und die allgemein erhöhte Serumkonzentration von IgM [355] deuten auf eine gestörte Isotyp-Umschaltung in andere Antikörper-Klassen infolge der fehlenden T-Zell-Hilfe hin. Im Duodenum gehen mit *T. whipplei* infizierte Plasmazellen zugrunde [357], was eine lokale Verringerung der Antikörperproduktion zur Folge hat [356, 358]. Da die IgA-Produktion in der Mukosa auch T-Zell-unabhängig erfolgen kann [359], ist eine sekretorische IgA-Antwort gegen *T. whipplei* für MW-Patienten charakteristisch [356, 360].

1.4 Arbeitshypothese und Fragestellungen

Die chronische Manifestation der *T. whipplei*-Infektion als klassischer MW scheint mit prädisponierenden immunologischen Faktoren assoziiert zu sein [287].

Charakteristisch für MW-Patienten ist die systemische Reduktion des Zytokins IL-12p40 [353] und das Fehlen einer *T. whipplei*-spezifischen Th1-Antwort [336]. Da nur DC die Fähigkeit besitzen, naive T-Zellen effizient zu aktivieren und durch die Sekretion großer Mengen IL-12 auf eine Th1-Antwort zu programmieren [20], könnte eine Dezimierung oder Dysfunktion der DC zur Entstehung des MW beitragen. Das Ausbleiben einer Entzündungsreaktion im Darm trotz des massiven Befalls mit *T. whipplei*, die alternative Aktivierung der Gewebe-infiltrierenden Makrophagen [338], die verringerte Th1-Reaktivität [354] und das anti-inflammatorische Zytokinmilieu [338, 352] deuten zudem auf eine Suppression von Th-Antworten und eine Beteiligung von T_{reg} an der Pathogenese des MW hin.

Daraus ergeben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen:

- 1.) Ist die DC-Population in Blut und Geweben von MW-Patienten verändert?
- 2.) Erfüllen DC von MW-Patienten ihre Funktion hinsichtlich Aufnahme und Präsentation von Antigenen, Erkennung von PAMP und Produktion von Zytokinen?
- 3.) Welchen Einfluss hat *T. whipplei* auf die Reifung und Funktion der DC?
- 4.) Wie wirkt sich die chronische Infektion mit *T. whipplei* auf die Zusammensetzung der CD4⁺ T-Zellpopulation und die Reaktivität der CD4⁺ Effektorzellen aus?
- 5.) Sind T_{reg} an der Kontrolle entzündlicher Prozesse in MW-Patienten beteiligt?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial dienten Heparinblut, Duodenalbiopsien und Lymphknotenpräparate von 111 Patienten mit einem klassischen MW (Kap.1.3.1) und 146 Kontrollpersonen ohne Hinweis auf eine chronische *T. whipplei*-Infektion. Zusätzlich wurden Biopsien aus der Haut und der Synovialmembran je eines MW-Patienten vor Beginn der Behandlung untersucht.

Die Diagnose des MW erfolgte auf der Grundlage von mindestens zwei verschiedenen Nachweismethoden (Kap.1.3.1; [289]). Die Mehrzahl der untersuchten MW-Patienten (94 %) litt unter gastrointestinalen Beschwerden, vier Patienten zeigten ausschließlich neurologische Symptome und drei Patienten einen isolierten Gelenkbefall. MW-Patienten mit aktivem IRIS [313] wurden von den Untersuchungen ausgeschlossen. Die Mehrzahl der MW-Patienten wurde für zwei Wochen intravenös mit Ceftriaxon behandelt, gefolgt von drei oder zwölf Monaten Cotrim (Trimethoprim-Sulfamethoxazol) (Kap. 1.3.1). Ein Patient erhielt lediglich Cotrim und sechs Patienten wurden alternativ mit Doxycyclin therapiert, davon drei in Kombination mit Hydroxychloroquin. Aufgrund rezidivierender Verläufe wurden zwei Patienten mit IFN- γ behandelt [361]. Während in 106 Patienten eine vollständige Remission erreicht wurde, litten vier MW-Patienten unter persistierenden Problemen aufgrund irreversibler Gewebeschäden. Die Proben von MW-Patienten wurden, je nach Behandlungszustand, den Gruppen „initial“ (vor bis drei Wochen nach Therapiebeginn) oder „behandelt“ (mehr als drei Wochen nach Beginn der Behandlung) zugeordnet. Von 17 MW-Patienten wurden Proben nur initial, von 53 MW-Patienten nur nach Behandlung und von 40 MW-Patienten initial und nach Behandlung entnommen (Tab. 2.1).

Um Alters-abhängige Effekte bei den Versuchen auszuschließen [362], wurden Blutproben von MW-Patienten und Kontrollpersonen mit gleicher Altersverteilung verwendet. Die Blutproben von 71 MW-Patienten und von 78 Kontrollpersonen wurden in Natrium-Heparin beschichteten Röhrchen (Vacutainer®, BD Biosciences) gesammelt und innerhalb von 24 h verarbeitet. Die Kontrollgruppe umfasste hierbei sowohl gesunde Personen (54), als auch Personen mit einer akuten Infektion durch Noroviren (sechs), enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC; elf) oder *Campylobacter* (sieben). Duodenalbiopsien wurden von 56 Patienten mit einem MW, acht Patienten mit einer akuten Norovirus-Infektion und 30 Kontrollpersonen ohne pathologische Veränderungen untersucht. Die Kontrollgruppe schloss hierbei Personen ein, die im Rahmen von Vorsorge- oder Nachsorge-Untersuchungen früherer Ulzerationen oder zur Differentialdiagnose unspezifischer gastrointestinaler oder unerklärbarer rheumatologischer Symptome gastroskopiert wurden. Eine weitere Kontrollgruppe bildeten Personen mit einer akuten Norovirus-Infektion. Die Duodenalbiopsien wurden entweder in

Natriumchlorid-Lösung überführt und sofort weiterverarbeitet (Kap. 2.8.1) oder zur histologischen Analyse in 4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) fixiert (Kap. 2.8.2).

In Paraffin eingebettete Lymphknotensektionen wurden von 16 MW-Patienten und von 27 Kontrollpersonen, davon 13 unauffällig mit entfernten Tumorerläsionen („normal“), acht mit einer Infektion durch *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberkulose) und sechs mit Sarkoidose, histologisch untersucht (Kap. 2.8).

Tab. 2.1: Untersuchte Proben von MW-Patienten und Kontrollpersonen

Proben	Morbus Whipple (MW)			Kontrollpersonen		
	Anzahl	Geschlecht [w/m]	Alter [Jahre]	Anzahl	Geschlecht [w/m]	Alter [Jahre]
Heparinblut	71 insgesamt 7 initial 43 behandelt 21 initial+behandelt	15 / 56	58 (37-77)	78 insgesamt 54 gesund 6 Norovirus 11 EHEC 7 Campylobacter	43 / 35 28 / 26 5 / 1 6 / 5 4 / 3	51 (27-84) 49 72 56 40
Duodenal- biopsien (fixiert)	56 insgesamt 5 initial 32 behandelt 19 initial+behandelt	12 / 44	57 (33-75)	38 insgesamt 30 gesund 8 Norovirus	16 / 22 14 / 16 2 / 6	50 (22-95) 47 69
Duodenal- Makrobiopsien (frisch)	2 behandelt (kein <i>T.whipplei</i> - Nachweis im Darm)	0 / 2	63 (52,73)	3 unauffällig	1 / 2	56 (26-75)
Lymphknoten (fixiert)	16 initial 14 <i>T.whipplei</i> + 2 <i>T.whipplei</i> -	1 / 15	55 (41-76)	27 insgesamt 13 unauffällig 8 Tuberkulose 6 Sarkoidose	15 / 11 8 / 4 2 / 6 5 / 1	54 (30-88) 59 46 54
Hautbiopsie (fixiert)	1 initial	0 / 1	59			
Synovial- membran- Biopsie (fixiert)	1 initial	0 / 1	68			

Angegeben sind Geschlecht (w, weiblich; m, männlich) und Durchschnittsalter (mit Alterspanne in Klammern).

Die Erlaubnis zur Probenentnahme wurde durch das Klinische Ethikkomitee der Charité erteilt und alle Teilnehmer gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung.

2.1.2 Antikörper

Antikörper für die magnetische Isolation von Zellpopulationen

<i>Spezifität</i>	<i>Herkunft, Isotyp</i>	<i>Klon</i>	<i>Konjugat</i>	<i>eingestetzte Verdünnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
CD14	Maus, IgG2a	Tük4	<i>MicroBeads</i>	1:10	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
HLA-DR	Maus, IgG1	n.b.	<i>MicroBeads</i>	1:10	Miltenyi Biotec
<i>CD4 Cocktail:</i>					
CD8	Maus IgG2a	BW135/80	Biotin	1:10	Miltenyi Biotec
CD14	Maus IgG2a	Tük4	Biotin		
CD16	Maus, IgM	VEP13	Biotin		
CD19	Maus IgG1	LT19	Biotin		
CD36	Maus IgG2a	AC106	Biotin		
CD56	Maus IgG1	AF12-7H3	Biotin		
CD123	Maus IgG2a	AC145	Biotin		
TCR γ/δ	Maus IgG1	11F2	Biotin		
CD235a	Maus IgG1	n.b.	Biotin		
Biotin	Maus, IgG1	n.b.	<i>MicroBeads</i>	1:5	Miltenyi Biotec
CD25	Maus, IgG1	n.b.	<i>MicroBeads</i>	1:20	Miltenyi Biotec

n.b., nicht bekannt.

Antikörper für die Zellkultur

<i>Spezifität</i>	<i>Herkunft, Isotyp</i>	<i>Klon</i>	<i>Reinheit</i>	<i>eingesetzte Konzentration</i>	<i>Bezugsquelle</i>
CD3 ϵ	Maus, IgG3 λ	SP34	NA/LE	3 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD28	Maus, IgG1 κ	CD28.2	NA/LE	2 $\mu\text{g/ml}$	BD Biosciences
CD49d	Maus, IgG1 κ	9F10	NA/LE	2 $\mu\text{g/ml}$	Dako, Glostrup, DK
IL-10	Ratte, IgG1 κ	JES3-9D7	<0,001 ng/ μg	2,5 $\mu\text{g/ml}$	eBioscience, Frankfurt, D
TGF- β 1,2,3	Maus, IgG1	1D11	<0,1 EU/ μg	0,5 $\mu\text{g/ml}$	R&D Systems, Wiesbaden, D
Isotypkontrolle	Maus, IgG1	11711	<0,1 EU/ μg	0,5 $\mu\text{g/ml}$	R&D Systems
Isotypkontrolle	Ratte, IgG1 κ	n.b.	<0,001 ng/ μg	2,5 $\mu\text{g/ml}$	eBioscience

NA/LE, *no azide, low endotoxin*, geringer Natriumazid- und Endotoxingehalt; EU, *endotoxin units*, Endotoxin-Verunreinigung, gemessen mittels *Limulus-Amöbozyten-Lysat*-(LAL-) Test, wobei 1 ng LPS etwa 1-10 EU entsprechen; n.b., nicht bekannt.

Antikörper für die Durchflusszytometrie

<i>Spezifität</i>	<i>Herkunft, Isotyp</i>	<i>Klon</i>	<i>Konjugat</i>	<i>eingestetzte Verdünnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
CD1a	Maus, IgG1 κ	HI149	PE-Cy5	1:20	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD3	Maus, IgG1 κ	SK7	PerCP	1:50	BD Biosciences
CD4	Maus, IgG1 κ	MT310	PE, APC	1:50	Dako, Glostrup, DK
	Maus, IgG1 κ	SK3	PerCP-Cy5.5	1:10	BD Biosciences
	Maus, IgG1 κ	RPA-T4	FITC, Pacific Blue	1:50	BD Biosciences
CD8	Maus, IgG1 κ	DK25	FITC	1:50	Dako
CD11b	Maus, IgG1 κ	ICRF44	Alexa488	1:20	BD Biosciences
CD11c	Maus, IgG2b κ	S-HCL-3	PE, APC	1:20	BD Biosciences
CD14	Maus, IgG2b κ	M ϕ P9	FITC	1:100	BD Biosciences
CD14	Maus, IgG2a κ	M5E2	PerCP-Cy5.5	1:100	BD Biosciences
CD16	Maus, IgG1 κ	3G8	FITC	1:20	BD Biosciences
CD16	Maus, IgM	VEP13	APC	1:20	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
CD25	Maus, IgG1 κ	M-A251	FITC, APC-H7	1:20	BD Biosciences
CD25	Maus, IgG2b	4E3	APC	1:20	Miltenyi Biotec
CD31	Maus, IgG1 κ	WM59	FITC	1:50	BD Biosciences
CD39	Maus, IgG1	MZ18-23C8	APC	1:50	Miltenyi Biotec
CD40	Maus, IgG1 κ	5C3	APC	1:10	BD Biosciences
CD45RA	Maus, IgG2b κ	HI100	PE-Cy7	1:50	eBioscience, Frankfurt, D
CD45RO	Maus IgG2a κ	UCH-L1	PE-Cy7	1:50	BD Biosciences
CD64	Maus, IgG1 κ	10.1	FITC	1:5	BD Biosciences
CD69	Maus, IgG2b κ	TP1.55.3	PE	1:200	Beckman Coulter, Krefeld
CD80	Maus, IgG1	MEM-233	APC	1:10	EXBIO, Prag, CZ
CD83	Maus, IgG1 κ	HB15e	APC	1:10	BD Biosciences
CD86	Maus, IgG1 κ	2331 FUN-1	APC	1:10	BD Biosciences
Fas (CD95)	Maus, IgG1 κ	DX2	PE-Cy5	1:50	BD Biosciences
CD123	Maus, IgG1 κ	9F5	PE	1:50	BD Biosciences
CD127	Maus, IgG1	R34.34	PE	1:10	Immunotech, Marseilles, F
CTLA-4	Maus, IgG2a κ	BN13	PE	1:10	BD Biosciences
CD40L	Maus, IgG1 κ	TRAP1	FITC	1:10	BD Biosciences
CCR2	Maus, IgG2b κ	48607	Alexa647	1:20	BD Biosciences
CCR5	Maus, IgG2a κ	3A9	PE	1:10	BD Biosciences
CCR6	Maus, IgG1	11A9	PerCP-Cy5.5	1:20	BD Biosciences
CCR7	Ratte, IgG2a κ	3D12	Alexa 647	1:20	BD Biosciences
DC-LAMP	Maus, IgG1 κ	I10-1112	APC	1:20	BD Biosciences
DC-SIGN	Maus, IgG2b κ	DCN46	PE	1:20	BD Biosciences
PD-L1	Maus, IgG1 κ	MIH1	APC	1:10	eBioscience
PD-1	Maus, IgG1 κ	MIH4	FITC	1:10	BD Biosciences
TLR4	Maus, IgG2a κ	HTA125	PE	1:20	eBioscience
CX ₃ CR1	Ratte, IgG2b	2A9-1	PE	1:20	MBL International, Woburn, USA

GITR	Maus, IgG	110416	APC	1:20	R&D Systems, Wiesbaden, D
HLA-DR	Maus, IgG2a κ	L243 G46-6	PerCP	1:20	BD Biosciences
Integrin β 7	Ratte, IgG2a κ	FIB504	PE	1:50	BD Biosciences
M-DC8	Maus, IgM	DD1	PE	1:10	Miltenyi Biotec
FoxP3	Ratte, IgG2a κ	PCH101	PE	1:5	eBioscience
IFN- γ	Maus, IgG1 κ	B27	APC	1:100	BD Biosciences
IL-10	Ratte, IgG2a	JES3-19F1	APC	1:20	BD Biosciences
IL-12	Maus, IgG1 κ	C11.5.14	APC	1:40	BD Biosciences
IL-23p19	Maus, IgG2b κ	23dcdp	eFluor660	1:20	eBioscience
IL-17A	Maus, IgG1 κ	eBio64DEC17	Alexa647	1:20	eBioscience
Isotyp-Kontrollen	Maus, IgG1 κ	MOPC-21	FITC, PE, PerCP, APC	entsprechend dem	BD Biosciences
	Maus, IgG1 κ	P3.6.2.8.1	Alexa647	verwendeten	eBioscience
	Maus IgG2a κ	MOPC-173	PE, APC PerCP-Cy5.5	spezifischen Antikörper	BD Biosciences
	Maus IgG2b	27-35	Alexa647, PE, FITC		BD Biosciences
	Ratte IgG2a	R35-95	PE, APC		BD Biosciences

Antikörper-Cocktails

<u>Lin 1:</u>				1:20	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD3	Maus, IgG1 κ	SK7	FITC		
CD14	Maus, IgG2b κ	M ϕ P9	FITC		
CD16	Maus, IgG1 κ	3G8	FITC		
CD19	Maus, IgG1 κ	SJ25C1	FITC		
CD20	Maus, IgG1 κ	L27	FITC		
CD56	Maus, IgG2b κ	NCAM16.2	FITC		
<u>BDCA:</u>				1:15	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
CD1c	Maus, IgG2a	AD5-8E7	PE		
BDCA-2	Maus, IgG1	AC144	FITC		
CD141	Maus, IgG1	AD5-14H12	APC		
CD14	Maus, IgG2a	TÜK4	PE-Cy5		
CD19	Maus, IgG1	LT19	PE-Cy5		

Antikörper für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Primärantikörper

<i>Spezifität</i>	<i>Herkunft, Isotyp</i>	<i>Klon</i>	<i>Antigen- Demaskierung</i>	<i>eingesetzte Verdünnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
CD1a	Kaninchen	EP3622	Citratpuffer pH6	1:500	Epitomics, Burlingame, USA
CD4	Maus IgG1	1F6	Citratpuffer pH6	1:100	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK
CD8	Kaninchen IgG	polyklonal	Citratpuffer pH6	1:800	Spring Bioscience, Pleasanton, USA
CD11c	Maus IgG2a	5D11	Citratpuffer pH6	1:300	Novocastra
CD45RO	Maus IgG2a κ	UCHL 1	Citratpuffer pH6	1:100	Dako, Glostrup, DK
CD163	Maus IgG1	10D6	Citratpuffer pH6	1:200	Novocastra

DC-LAMP	Maus, IgG1	104.G4	Citratpuffer pH6	1:50	Immunotech, Marseille, F
DC-SIGN	Maus IgG2b	111H2.02	Citratpuffer pH6	1:200	Dendritics, Lyon, F
FoxP3	Ratte IgG2a κ	PCH101	Citratpuffer pH6	1:200	eBioscience, Frankfurt, D
Ki-67	Maus IgG1 κ	MIB-1	Citratpuffer pH6	1:1000	Dako
S-100	Kaninchen	polyklonal	Citratpuffer pH6	1:1000	Dako
<i>T. whipplei</i>	Kaninchen	polyklonal	nicht notwendig	1:20000	Prof. D. Raoult, Unité des Rickettsies, Marseille, F [298]

Sekundärantikörper/Detektionssysteme

<i>Spezifität</i>	<i>Herkunft/ Name</i>	<i>Konjugat</i>	<i>eingesetzte Verdünnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Maus IgG	Esel IgG	Biotin	1:400	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK
Ratte IgG	Kaninchen	Biotin	1:300	Dako, Glostrup, DK
Kaninchen IgG	Esel IgG	Biotin	1:400	Jackson ImmunoResearch
Kaninchen IgG	Esel	Alexa488	1:1000	Life Technologies, Darmstadt, D
Maus IgG	Esel IgG Fab-Fragment	Indocarbocyanin (Cy3)	1:100	Dianova, Hamburg, D
Biotin	Streptavidin aus <i>Streptomyces avidinii</i>	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	1:100 (10 µg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Biotin	Streptavidin aus <i>Streptomyces avidinii</i>	Alkalische Phosphatase (AP)	1:200 (5 µg/ml)	Sigma-Aldrich
Biotin	Streptavidin aus <i>Streptomyces avidinii</i>	Cy3	1:200	Dianova
F-Aktin	Phalloidin	Alexa647	1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
DNA	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)		1:2000	Roche, Mannheim, D

2.1.3 Zytokine und Wachstumsfaktoren

<i>Protein</i>	<i>Stammlösung</i>	<i>eingesetzte Konzentration</i>	<i>Bezugsquelle</i>
rh IFN-γ	100 µg/ml in PBS/BSA	10 ng/ml	R&D Systems, Wiesbaden, D
rh GM-CSF (Leukine Liquid Sargramostin)	5 x 10 ⁵ U/ml in PBS 0,1 % HSA	10 ³ U/ml	Berlex Laboratories, Richmond, USA
rh IL-4	10 µg/ml in PBS 0,1 % HSA	2,5 ng/ml	R&D Systems
rh TNF-α	5 µg/ml in PBS 0,1 % HSA	10 ng/ml	R&D Systems
rh IL-1β	10 µg/ml in PBS 0,1 % HSA	20 ng/ml	R&D Systems
PGE ₂	1 M in 35 % Ethanol , 65 % PBS 0,1 % HSA	1 µM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
rh IL-6	5 µg/ml in PBS 0,1 % HSA	3,3 ng/ml	R&D Systems
rh IL-16	5 µg/ml in PBS/BSA	10 ng/ml	R&D Systems
rh IL-2 (Proleukin®S)	10 ⁷ U/ml in Aq. dest..	20 U/ml	Chiron Behring, Marburg, D

rh, rekombinant human; HSA, humanes Serumalbumin; U, *unit*, (internationale) Einheiten

2.1.4 Antigene und Stimulanzen

<i>Protein</i>	<i>Stammlösung</i>	<i>eingesetzte Konzentration</i>	<i>Bezugsquelle</i>
LPS (aus <i>Escherichia coli</i> O111:B4)	5 mg/ml in DMSO; mit PBS auf 1mg/ml weiterverdünnt	10 µg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
<i>T. whipplei</i> -Lysat	2 – 5 x10 ⁸ CFU/ml; in DMEM-Kulturmedium (Kap. 2.7.1)	10 ⁷ CFU/ml	A. Moter, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité Berlin
CMV-Antigen (AD169)	0,25 mg/ml; in 0,1 M Glycinpuffer pH 9,5	1,5 µg/ml	Dunn Labortechnik, Asbach, D
Tuberkulin GT 1000 PPD	10 ⁴ TE (PPD)/ml; in physiologischer Kochsalzlösung mit Phenol	60 TE/ml	Chiron Behring, Marburg, D
SEB	1 mg/ml in PBS	2 µg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

LPS, Lipopolysaccharid; CFU, *colony-forming unit*, Koloniebildende Einheit; CMV, Cytomegalievirus; PPD, *purified protein derivative*, gereinigtes Protein; TE, Tuberkulineinheiten (2 TE entsprechen 1 PPD-Standard); SEB, Staphylokokken-Enterotoxin B.

2.2 Zellkulturtechniken

2.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zellkultur-Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank (Herasafe; Heraeus, Hanau, D) mit laminarer Luftströmung durchgeführt, um eine keimarme Umgebung zu gewährleisten. Die Kultivierung von Vollblut oder isolierten Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank (BB 15; Heraeus), in dem 37 °C und eine mit 5 % CO₂ angereicherte wasserdampfgesättigte Atmosphäre herrschten. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Zentrifugationsschritte für 7 min bei 350 xg und 4 °C in der Kühlzentrifuge Megafuge 1.0R (Heraeus) durchgeführt.

Für alle Zellkulturversuche wurde R10-Kulturmedium verwendet. Das verwendete fötale Kälberserum (FCS) wurde vorher zur Inaktivierung des Komplements für 30 min im Wasserbad bei 56 °C inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

R10-Kulturmedium:

- RPMI 1640 *GlutaMAX*
- 10 % (v/v) FCS
- 25 mM HEPES
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin

RPMI 1640 *GlutaMAX* Grundmedium wurde von Gibco/Life Technologies (Darmstadt, D), FCS von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D), HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) von PAA Laboratories (Pasching, A) und Penicillin/Streptomycin von Biochrom (Berlin, D) bezogen.

2.2.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) wurden mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus Heparin-Blut gewonnen. Vorbereitend wurden dafür 15 ml *Ficoll PaqueTM Premium* (GE Healthcare, Freiburg, D) in ein 50 ml-*LeucosepTM*-Röhrchen (Greiner bio-one, Frickenhausen, D) gefüllt und durch kurzes Zentrifugieren unter die Trennscheibe gebracht. Anschließend wurden pro *LeucosepTM*-Röhrchen zwischen 10 und 25 ml unverdünntes Blut darüber geschichtet und bei 1000 xg und Raumtemperatur ohne Bremse für 10 min zentrifugiert. Dabei sammelten sich die mononukleären Zellen (Monozyten, Lymphozyten) über der Ficoll-Lösung in der Interphase, während Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen aufgrund ihrer höheren Dichte unter der Trennscheibe ein Pellet bildeten. Nach der Entfernung des oben aufliegenden Plasmas wurden die mononukleären Zellen der Interphase mit einer Pipette vorsichtig abgenommen, in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen (*FalconTM*; BD Biosciences, Heidelberg, D) überführt und in PBS/BSA gewaschen.

Zur Lyse der verbliebenen Erythrozyten wurden die PBMC in 5 ml Erythrozytenlysepuffer aufgenommen und darin für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die PBMC zweimal im 5 bis 10-fachen Volumen PBS/BSA gewaschen, gezählt (Kap. 2.2.4) und entweder in den entsprechenden Puffer für die Weiterverarbeitung überführt oder in PBS/BSA bei 4 °C gelagert.

PBS:	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	8,1 Na ₂ PO ₄
	pH 7,2
PBS/BSA:	PBS pH 7,2
	0,5 % (w/v) BSA
Erythrozytenlysepuffer:	Aq. dest.
	10 mM KHCO ₃
	155 mM NH ₄ Cl
	0,1 mM EDTA

Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (PBS, *phosphate buffered saline*) wurde als gebrauchsfertiger Puffer von der Fa. PAA Laboratories bezogen. Rinderserumalbumin (BSA, *bovine serum albumin*) und EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) stammten von Sigma-Aldrich, Ampuwa® Spüllösung von Fresenius Kabi (Bad Homburg, D) und die restlichen Chemikalien von Carl Roth (Karlsruhe, D).

2.2.3 Magnetische Isolierung von Zellpopulationen

Zur Isolierung verschiedener Zellpopulationen wurde das magnetische Zellsortierungssystem *MACS* (*magnetic-activated cell sorting*) verwendet [363]. Dieses System basiert auf der Markierung bestimmter Zellpopulationen mit Antikörpern gegen Zelltyp-spezifische Oberflächenantigene, die entweder direkt oder über anti-Biotin-Antikörper an superparamagnetische Mikropartikel (*MicroBeads*) gekoppelt sind. Die Trennung der Zellen erfolgt in einem Hochgradienten-Magnetfeld, das durch Einbringen einer mit ferromagnetischer Stahlwolle gefüllten Säule in einen Permanentmagneten erzeugt wird. Alle nicht markierten Zellen (Negativfraktion) passieren die Trennsäule ungehindert, während die markierten Zellen, die das entsprechende Antigen exprimieren, von der Säulenmatrix zurückgehalten werden (Positivfraktion). Dieses System eignet sich sowohl zur Positivselektion einer Zellpopulation als auch zur Anreicherung bestimmter Zellen durch Depletion der unerwünschten Zellpopulationen aus einer Suspension (Negativselektion).

Die für die Isolation erforderlichen konjugierten Antikörper, Kits, Säulen, Pre-Separationsfilter und Magneten wurden von der Fa. Miltenyi Biotec bezogen und gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet.

Als Ausgangsmaterial für die Positivselektion von CD14⁺ Monozyten dienten PBMC (Kap. 2.2.2). Aus der CD14⁻ Negativfraktion wurden, durch Depletion der HLA-DR⁺ Zellen, T-Zellen (HLA-DR⁻) isoliert. PBMC wurden ebenfalls verwendet, um CD4⁺ T-Zellen über Negativselektion, also durch Abtrennung aller anderen Zellpopulationen zu gewinnen. Dadurch wurden Antigen präsentierende Zellen (HLA-DR⁺) in der Positivfraktion angereichert. Die CD4⁺ T-Zellen wurden weiterverwendet, um CD25⁺ regulatorische T-Zellen (T_{reg}) von CD25⁻ Effektor-T-Zellen (T_{eff}) zu trennen.

Zunächst wurden die Zellen einmal in MACS-Puffer gewaschen und das Zellpellet pro 1 x 10⁸ Zellen in 900 µl MACS-Puffer resuspendiert. Bei den Positivselektionen wurden 100 µl der entsprechenden Mikropartikel-gekoppelten Antikörper (anti-CD14, anti-HLA-DR oder anti-CD25 *MicroBeads*) pro 1 x 10⁸ Zellen zugegeben, gründlich durchmischt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Für die Negativselektion von CD4⁺ T-Zellen wurden zu je 1 x 10⁸ Zellen zunächst 100 µl Biotin-Antikörper-Cocktail (bestehend aus Antikörpern gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ und CD235a) zugefügt und nach 10 min Inkubation bei 4 °C durch 200 µl anti-Biotin-Mikropartikel für weitere 15 min Inkubation ergänzt. In der Zwischenzeit wurde die entsprechende Säule (*MS*: bis 5 x 10⁷ Zellen; *LS*: bis 2 x 10⁹ Zellen; *LD*: für Depletion, bis 5 x 10⁸ Zellen) in den passenden Magneten (*MS*: *MiniMACS*; *LS* und *LD*: *MidiMACS*) positioniert und mit MACS-Puffer (*MS*: 0,5 ml;

LS: 3 ml; *LD*: 2 ml) äquilibriert. Nach dem Auswaschen der nicht gebundenen Antikörper im 10-fachen Volumen MACS-Puffer wurden die Zellen in einer Konzentration von 5×10^7 /ml in mindestens 0,5 ml MACS-Puffer gründlich resuspendiert und, wenn nötig, zur Vereinzelnung der Zellen über einen Prä-Separationsfilter auf die entsprechende Säule gegeben. Die Negativfraktion (CD14⁻, HLA-DR⁻, CD4⁺ T-Zellen oder CD25⁻ Zellen) wurde in einem unter dem Säulenauslauf positionierten 50 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt. Sobald die Suspension die Säulenmatrix vollständig durchlaufen hatte, wurde die Säule mit dem entsprechendem Volumen MACS-Puffer (*MS*: 0,5 ml; *LS*: 3 ml; *LD*: 2 ml) nachgespült. Nach der Wiederholung dieses Spülvorgangs (*MS* und *LS*: dreimal; *LD*: zweimal) wurde die Säule aus dem Magneten entnommen und die darin gebundenen positiv selektierten Zellen wurden mit MACS-Puffer (*MS*: 3 ml; *LS* und *LD*: 5 ml) durch Aufdrücken des Stempels eluiert. Die so getrennten Zellpopulationen wurden je nach weiterer Verwendung zunächst mit dem 10-fachen Volumen PBS (CD4⁺, CD25⁻CD4⁺) oder Kulturmedium (CD14⁺, HLA-DR⁻CD14⁻, CD4⁻, CD25⁺CD4⁺) gewaschen, gezählt und entweder für die CFSE-Markierung (Kap. 2.2.6) in PBS oder für die anschließende Kultivierung in Kulturmedium (Kap. 2.2.7 und 2.4.4) überführt. HLA-DR⁻CD14⁻ Zellen wurden bis zur Verwendung als autologe T-Zellen für Versuche zur Antigen-spezifischen Aktivierung durch DC (Kap. 2.4.3) eingefroren (Kap 2.2.5).

MACS-Puffer: PBS pH 7,2
 0,5 % (w/v) BSA
 1 mM EDTA

Zur Überprüfung des Separationsergebnisses wurde die Reinheit der Negativ- und Positivfraktion durchflusszytometrisch bestimmt (Tab. 2.2).

Tab. 2.2: Ausbeute und Reinheit der durch magnetische Isolation erhaltenen Zellpopulationen

<i>Population</i>	CD14 ⁺	HLA-DR ⁻	CD4 ⁺	CD4 ⁻	CD25 ⁺	CD25 ⁻
<i>Quelle</i>	PBMC	CD14 ⁻	PBMC	PBMC	CD4 ⁺	CD4 ⁺
<i>Ausbeute pro 1 x 10⁸ PBMC</i>	0,4 – 6,1 x 10 ⁷	1,5 – 8,5 x 10 ⁷	0,4 – 3,1 x 10 ⁷	1 – 9,6 x 10 ⁷	0,6 – 8,8 x 10 ⁵	0,2 – 4,9 x 10 ⁷
<i>Reinheit</i>	92 (±3) % CD14 ⁺	< 1 (±0) % HLA-DR ⁺	93 (±2) % CD3 ⁺ CD4 ⁺	30 (±2) % HLA-DR ⁺	55 (±4) % CD4 ⁺ CD25 ⁺	8 (±1) % CD4 ⁺ CD25 ⁺

Für die Ausbeute ist die Spanne und für die Reinheit ist der jeweilige Mittelwert (±SEM) angegeben. n = 36 (CD14), 20 (HLA-DR) oder 14 (CD4 und CD25).

2.2.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen in einem definierten Suspensionsvolumen erfolgte nach Trypanblau-Färbung in einer Zählkammer. Trypanblau ist ein anionischer nicht membrangängiger Azofarbstoff, der nur über geschädigte Membranen in die Zellen gelangt und somit ausschließlich tote

Zellen blau färbt, während lebende Zellen ungefärbt bleiben. Hierzu wurden 10 µl Zellsuspension, je nach Zelldichte entweder 1:3 oder 1:10 mit Trypanblaulösung (Sigma-Aldrich) gemischt und in eine Zählkammer (KOVA[®] Objektträger 10 mit Raster; Hycor Biomedical, Kassel, D) überführt.

Trypanblaulösung: 0,4 % (w/v) Trypanblau in 0,9 %iger NaCl-Lösung

Die Zählung der Zellen erfolgte unter einem inversen Durchlichtmikroskop vom Typ *Axiinvert 25* (Carl Zeiss, Jena, D). Zur Berechnung der Zellzahl pro ml Suspension wurde der Mittelwert aus der jeweiligen Zellzahl in drei von neun Quadraten ermittelt und mit dem Kammerfaktor 1×10^4 und dem Verdünnungsfaktor (VF) multipliziert.

$$\frac{\text{Anzahl vitaler Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadrate}} \times 10^4 \times \text{VF} = \text{Zellzahl/ml Suspension}$$

2.2.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen (z.B. T-Zellen) in einer Konzentration von $0,5 - 1 \times 10^7$ Zellen pro ml in Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden, D) überführt. Um Zellschäden zu vermeiden, wurde zum einen Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich) zugesetzt, das die Eiskristallbildung innerhalb und außerhalb der Zellen verhindert. Zum anderen erfolgte das Abkühlen auf -80 °C schrittweise in einem isopropanolgefüllten Kryobehälter (*Nalgene[®] 5100 Cryo 1 °C Freezing Container*; Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D). Für eine Langzeitlagerung wurden die Zellen anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium: FCS
10 % (v/v) DMSO

Das Auftauen der T-Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C . Sobald sich das Medium im Kryoröhrchen zu verflüssigen begann, wurden die Zellen in 10 ml kaltes Kulturmedium überführt und zentrifugiert, um das für die Zellen toxische DMSO zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in PBS resuspendiert und sofort weiterverarbeitet (Kap. 2.2.6).

2.2.6 CFSE-Markierung von Zellen

Die CFSE-Markierung von Zellen ermöglicht es, die Proliferation in bestimmten Zellpopulationen durchflusszytometrisch zu detektieren [364]. Carboxyfluorescein Diacetat-Succinimidyl Ester (CFDA-SE) ist ein membrangängiger Vitalfarbstoff, der als unpolares Molekül in die Zelle diffundiert und durch Esterasen im Zytoplasma in das Amin-reaktive fluoreszierende Carboxyfluorescein-

Succinimidyl Ester (CFSE) umgewandelt wird. Durch dessen kovalente Bindung an Aminogruppen zellulärer Proteine erhalten die Zellen eine stabile, langanhaltende Fluoreszenzmarkierung. Bei jeder Zellteilung wird der Farbstoff gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt, so dass sich die Intensität des Fluoreszenzsignals halbiert. Anhand der Abnahme des Fluoreszenzsignals lässt sich die Proliferation der Zellen über acht bis zehn Zellteilungen durchflusszytometrisch verfolgen [365]. Dabei repräsentiert jeder Fluoreszenz-Peak eine neue Zellteilungsrunde, während die darunterliegende Fläche die Anzahl der Zellen in einem Teilungszyklus beschreibt.

Zur Markierung wurden die Zellen (PBMC, $CD4^+$, $CD25^- CD4^+$ oder $CD14^- HLA-DR^+$) in PBS gewaschen und auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen pro 1 ml PBS gebracht. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem gleichen Volumen CFDA/SE-Arbeitslösung (*Molecular Probes*[®]/Life Technologies, Darmstadt, D) vermischt (Endkonzentration: 0,5 μ M CFDA-SE/ml) und für 3 min bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Nach der Einwirkzeit wurden die markierten Zellen zweimal in R10-Kulturmedium gewaschen, gezählt und in der benötigten Konzentration zu den Versuchsansätzen (Kap. 2.4.3 und 2.4.4) gegeben.

CFDA/SE-Arbeitslösung: PBS pH 7,2
 1 μ M (v/v) CFDA-SE (Stammlösung: 5 mM in DMSO)

2.2.7 Generierung von DC aus Monozyten

Dendritische Zellen (DC) können *in vitro* aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes generiert werden [80]. Dazu haben verschiedene Arbeitsgruppen unterschiedliche Protokolle etabliert [80, 366, 367, 104], aus denen Schuler und Kollegen schließlich ein Standard-Protokoll zur Generierung und Aktivierung von DC ableiteten [368]. Dieses erfordert einen Differenzierungszeitraum von fünf bis sieben Tagen, um $CD14^+$ Monozyten durch Inkubation mit Interleukin (IL)-4 und Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) zu unreifen DC zu differenzieren, gefolgt von weiteren zwei bis drei Tagen für die Ausreifung durch Zugabe der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , Prostaglandin (PG) E_2 , Tumornekrosefaktor (TNF)- α und IL-6 [368]. Dauer und Kollegen etablierten daraus eine verkürzte Methode, mit der sich bereits innerhalb von 48 h phänotypisch ausgereifte und funktionelle DC *in vitro* generieren lassen [369].

Auch eigene Vorversuche zeigten hinsichtlich Phänotyp und Funktion keine Unterschiede zwischen den nach Standard-Protokoll von Schuler [368] und den nach verkürztem Protokoll von Dauer [369, 370] generierten DC. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der Heparin-Blutproben sowie des geringeren Aufwands an Zeit und Kosten wurde die verkürzte Methode [369, 370] favorisiert und geringfügig modifiziert.

Die magnetisch isolierten $CD14^+$ Monozyten (Kap. 2.2.3) wurden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in R10-Kulturmedium aufgenommen und, je nach Ausgangszellzahl, in eine

Zellkulturplatte (Nunc) mit der entsprechenden Anzahl an Vertiefungen (6: je 3,5 ml; 24: je 1 ml; 48: je 500 µl; 96: 200 µl Zellsuspension) überführt. Durch die Zugabe von 1000 U/ml GM-CSF und 2,5 ng/ml IL-4 für 36 h differenzierten die Monozyten zu unreifen DC. Diese wurden durch die Aktivierung mit 10 ng/ml TNF- α , 20 ng/ml IL-1 β , 1 µM PGE₂ und 3,3 ng/ml IL-6 in 24 h ausgereift. Die so generierten DC werden im Folgenden aufgrund ihres zellulären Ursprungs als Mo-DC bezeichnet.

Mo-DC, die zur Aktivierung autologer Antigen-spezifischer T-Zellen verwendet werden sollten, wurden zusätzlich mit dem entsprechenden Antigen (*T. whipplei*-Lysat: 10⁷ CFU/ml oder CMV: 1,5 µg/ml) beladen, welches zusammen mit den pro-inflammatorischen Zytokine zur Induktion der Reifung zugegeben wurde.

Zur Ernte wurden die semi-adhärennten Mo-DC durch kräftiges Resuspendieren vom Boden der Kulturplatte gelöst, in Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Wenn nötig, wurde die Kulturplatte mit eiskaltem PBS nachgespült, um verbliebene Zellen zu lösen. Der unverdünnte Kulturüberstand wurde komplett abgenommen und für spätere Messungen der Zytokinkonzentration (Kap. 2.6) bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden entweder zur phänotypischen Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie einmal in PBS gewaschen und anschließend in die entsprechende Färbelösung überführt (Kap 2.5.2) oder für funktionelle Analysen (Kap. 2.4.1 und 2.4.3) in der benötigten Zellzahl in R10-Kulturmedium (ohne Zytokine) resuspendiert.

2.3 Vollblutstimulation

Die Vollblutstimulation ermöglichte es, die Aktivierbarkeit von DC und T-Zellen, ohne vorherige Separation mononukleärer Zellen, direkt im peripheren Blut *ex vivo* zu untersuchen [371]. Dazu wurden pro Ansatz 0,5 ml frisches Heparinblut in sterilen 15 ml-Zentrifugenröhrchen (*Falcon*TM, BD Biosciences) für 6 h mit verschiedenen Antigenen bzw. Stimulanzen in den in Kap. 2.1.4 beschriebenen Endkonzentrationen inkubiert. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne Stimulus mitgeführt, der gegebenenfalls als Hintergrundwert von allen Messwerten abgezogen wurde. Für die Analyse von T-Zellreaktionen diente als Positivkontrolle das Superantigen Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB), welches, unabhängig von der Prozessierung durch Antigen präsentierende Zellen, die Außenseite von HLA-Klasse II-Molekülen mit bestimmten V β -Domänen des T-Zellrezeptors verbindet und so eine polyklonale Aktivierung von T-Zellen unabhängig von deren Spezifität induziert [372]. Allen anderen Stimulationsansätzen wurden zusätzlich noch anti-CD28 und anti-CD49d Antikörper zugesetzt, um den T-Zellen die notwendigen kostimulatorischen Signale zur Verfügung zu stellen [373, 374].

Zur Aktivierung von DC, insbesondere von myeloiden DC (M-DC), wurde Lipopolysaccharid (LPS) verwendet, ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, der über den Toll-like Rezeptor (TLR) 4 auf der Oberfläche der M-DC erkannt wird [95, 98].

Für die Untersuchung der phänotypischen Veränderungen der DC wurden die Ansätze nach der Inkubationszeit zu jeweils 100 µl auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, D) verteilt und darin direkt mit den entsprechenden Fluorochrom-markierten Antikörpern gefärbt (Kap. 2.5.2).

Zur intrazellulären Anreicherung der induzierten Zytokine wurden für die letzten 3 h der Inkubationszeit entweder 10 µg/ml Brefeldin A (für IFN- γ , IL-12 und IL-23) oder 1,3 µg/ml Monensin (für IL-10) zugegeben. Während Brefeldin A die Exozytose blockiert [375], neutralisiert Monensin den pH-Wert in den endozytotischen Vesikeln und verhindert so den Abbau der darin enthaltenen Proteine [350]. Nach Abschluss der Stimulation wurde EDTA-Lösung in einer Endkonzentration von 2 mM zum Blut gegeben, gründlich durchmischt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut gemischt, um adhärenzte Zellen von der Innenwand des Zentrifugenröhrchens zu lösen. Durch Zugabe des 5-fachen Volumens *1x FACS Lysing* wurden zum einen die Erythrozyten lysiert und zum anderen die Leukozyten leicht fixiert. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung durch Zentrifugation entfernt und das Zellpellet in PBS/BSA/Azid (PBA) gewaschen. Während die Zellen für die Analyse der T-Zellreaktivität in PBA aufgenommen wurden, mussten die Zellen für die Untersuchung der DC-Aktivierung zunächst fixiert werden (Kap. 2.5.3). Alle Ansätze wurden schließlich bis zur Färbung (Kap. 2.5.4) in PBA bei 4 °C für maximal 48 h gelagert.

Brefeldin A-Lösung: 0,1 mg/ml Brefeldin A (Stammlösung: 5 mg/ml in Ethanol) in PBS

EDTA-Lösung: PBS
20 mM EDTA

1x FACS-Lysing: Aq. dest.
10x FACSTM Lysing Solution

PBA: PBS pH 7,2
0,5 % (w/v) BSA
0,02 % (w/v) NaN₃

10x FACSTM Lysing Solution und Monensin (*GolgiStopTM*) wurden von BD Biosciences, Brefeldin A von Sigma-Aldrich und Natriumazid (NaN₃) von Merck (Darmstadt, D) bezogen.

2.4 *In vitro*-Versuche zur Funktionalität isolierter Zellen

2.4.1 Bestimmung der Endozytosekapazität von DC

Die Endozytosekapazität unreifer Mo-DC wurde anhand der Aufnahme von FITC-gekoppeltem Dextran durchflusszytometrisch analysiert. Bei den verwendeten Dextranen handelt es sich um hydrophile inerte Polysaccharide mit einem Molekulargewicht von 40 kDa, die über Makropinozytose in die Zelle gelangen.

Für den Endozytostest wurden unreife Mo-DC nach 40 h in Kultur geerntet und in einer Konzentration von je 1×10^5 Zellen in 100 μ l R10-Kulturmedium auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) verteilt. Zunächst wurden die Mo-DC für 30 min auf Eis äquilibriert und anschließend in Gegenwart von 10 μ g/ml Dextran-FITC (*Molecular Probes*[®]/Life Technologies) bei 37 °C unter Lichtausschluss für weitere 30 min inkubiert. Für jeden Ansatz wurde ein Kontrollansatz auf Eis mitgeführt, um das Ausmaß des passiven Transports durch Diffusion in die Zelle zu bestimmen. Danach wurden die Mo-DC zweimal im 10-fachen Volumen kalten R10-Kulturmedium und einmal in PBS gewaschen, fixiert (Kap. 2.5.3) und zur durchflusszytometrischen Messung in 200 μ l PBA überführt.

Dextran-FITC Stammlösung: 25 mg/ml in PBS

2.4.2 Untersuchung der Phagozytose von *T. whipplei* durch DC in Zytospins

Zur Untersuchung der Aufnahme und Prozessierung von *T. whipplei* in DC wurden in 15 ml-Zentrifugenröhrchen jeweils 2×10^6 unreife Mo-DC in 1 ml RPMI-Medium ohne Antibiotika-Zusatz mit 5×10^7 *T. whipplei*-Bakterien für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Mo-DC zweimal in Medium und einmal in PBS gewaschen, um nicht internalisierte Bakterien zu entfernen und in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen pro ml in PBS resuspendiert.

Für die Zytozentrifugation wurden jeweils 100 μ l dieser Zellsuspension (5×10^5 Mo-DC) in einen Fülltrichter (Thermo Shandon, Frankfurt, D) gegeben, der mit einer Metallklemme auf einem Objektträger (*SuperFrost*[®] Plus; Menzel-Gläser, Braunschweig, D) mit aufliegender Filterkarte (Whatman, Dassel, D) befestigt war. Durch 7-minütige Zentrifugation in einer Zytozentrifuge (*Cytospin 2 Cytofuge*; Thermo Shandon, Frankfurt, D) bei 100 xg und Raumtemperatur wurden die Zellen auf eine kleine kreisrunde Fläche auf dem Objektträger transferiert, wobei die Flüssigkeit von dem saugfähigen Filterpapier aufgenommen wurde. Nach der Lufttrocknung wurden die Zytospins in 1 % PFA-Lösung für 60 min bei 4 °C fixiert und bis zur Färbung bei -80 °C aufbewahrt.

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurde in den Zytospins die Lokalisation von *T. whipplei* in verschiedenen Kompartimenten der DC visualisiert. Dazu wurden Primärantikörper

verwendet, die spezifisch an die gewünschten Zielstrukturen binden und über Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper markiert werden können.

Vor der Färbung wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine 20-minütige Behandlung mit IF-Blockierungslösung abgesättigt. Diese enthielt, wie auch der Färbepuffer-4, in welchem die Antikörper verdünnt wurden, Normalserum aus Esel (tebu-bio, Offenbach, D), der Wirtsspezies des Sekundärantikörpers. Zuerst wurden DC-Antigene durch spezifische Primärantikörper (aus Maus) detektiert und mit gegen Maus-Immunglobulin (Ig) gerichteten Indocarbocyanin (Cy3)-gekoppelten Sekundärantikörpern markiert. Danach wurden *T. whipplei*-Bakterien durch spezifische Primärantikörper (aus Kaninchen) [298] gebunden und mit Hilfe von AlexaFluor488-konjugierten anti-Kaninchen-Ig Sekundärantikörpern visualisiert. Um Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper untereinander zu vermeiden, wurden für die Doppelfärbung Sekundärantikörper-Konjugate aus derselben Wirtsspezies (hier: Esel) verwendet. Die entsprechend in Färbepuffer-4 verdünnten Antikörper (Kap. 2.1.2) wurden einzeln und nacheinander zu je 50 µl auf die Zytospins aufgetragen und für jeweils 60 min (Primärantikörper) bzw. 45 min (Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper) lichtgeschützt in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Zytospins gründlich mit PBS gespült. Abschließend wurden die Zellkerne durch eine 10-minütige Inkubation mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; Verdünnung: 1:2000; Roche, Mannheim, D) markiert. Zur Konservierung wurden die Zytospins mit *Fluoromount-G* (Southern Biotech, Birmingham, UK) eingebettet, mit einem Deckgläschen bedeckt und bis zur konfokalmikroskopischen Auswertung (Kap. 2.8.4) bei 4 °C gelagert.

IF-Blockierungslösung: PBS
 10 % (v/v) Eselserum
 0,1 % (w/v) Saponin

Färbepuffer-4: PBS
 3 % (v/v) Eselserum
 0,1 % (w/v) Saponin

2.4.3 Analyse der Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen durch DC

Zur Untersuchung der Fähigkeit der DC, Antigen-spezifische T-Zellen durch Antigenpräsentation und Kostimulation zu aktivieren, wurden Antigen-beladene Mo-DC mit autologen CFSE-markierten T-Zellen kokultiviert und deren Aktivierungsgrad anhand von Proliferation und IFN- γ Produktion bestimmt.

Zunächst wurden autologe T-Zellen (HLA-DR⁻ CD14⁻; Kap 2.2.3) aufgetaut (Kap. 2.2.5) und mit CFSE markiert (Kap. 2.2.6). Die Kokultur von CFSE-markierten T-Zellen und Mo-DC wurde in Flachboden-Zellkulturplatten (Nunc) mit 96 Vertiefungen und jeweils 200 µl Gesamtvolumen angelegt. Hierfür wurden zu jeweils 2×10^5 CFSE-markierten T-Zellen pro Vertiefung reife Mo-DC (Kap. 2.2.7) in verschiedenen Konzentrationen (0; $0,25 \times 10^4$; $0,5 \times 10^4$; 1×10^4 ; 2×10^4 ; 4×10^4) gegeben und für vier Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Neben Mo-DC, die mit Antigenen wie *T. whipplei*-Lysat oder CMV (Kap. 2.1.4) beladen waren, wurden auch unbeladene Mo-DC verwendet. Ansätze mit unbeladenen Mo-DC dienten einerseits zur Bestimmung der unspezifischen T-Zellaktivierung. Andererseits waren Ansätze, die unbeladene DC und 2 µg/ml SEB erhielten, die Positivkontrolle für die T-Zellaktivierung. Für die letzten vier Stunden der Inkubationszeit wurden 10 µg/ml Brefeldin A zugesetzt, um das induzierte IFN-γ intrazellulär nachweisen zu können. Nach Fixierung und Färbung wurden die Proliferation anhand der Ausdünnung der CFSE-Fluoreszenz und die IFN-γ Produktion der aktivierten T-Zellen durchflusszytometrisch gemessen.

2.4.4 Untersuchung der Aktivität und Spezifität von T_{reg}

Zur Überprüfung des allgemeinen suppressiven Potenzials der T_{reg}, wurden CD4⁺ Effektor-T-Zellen (T_{eff}) in Anwesenheit definierter Konzentrationen T_{reg} polyklonal stimuliert.

Die Kokultur von T_{eff} und T_{reg} erfolgte in Rundboden-Zellkulturplatten (Nunc) mit 96 Vertiefungen, welche vorher mit je 0,6 µg anti-CD3 Antikörpern über Nacht beschichtet und mit PBS gespült wurden. In Dreifachansätzen wurden magnetisch isolierte CD25⁺CD4⁺ (T_{reg}) in verschiedenen Konzentrationen (0; $0,625 \times 10^4$; $1,25 \times 10^4$; $2,5 \times 10^4$; 5×10^4 ; 4×10^4) zu jeweils 5×10^4 CFSE-markierten CD25⁻CD4⁺ (T_{eff}) in einem Gesamtvolumen von 200 µl gegeben und in Anwesenheit von 1 µg/ml anti-CD28 Antikörpern für vier Tage inkubiert. Um auszuschließen, dass die Erhöhung der Gesamtzellzahl infolge der Zugabe der T_{reg} die T-Zellaktivierung beeinflusst, wurden neben T_{reg}-depletierten Ansätzen mit 5×10^4 T_{eff}, auch Ansätze mit der doppelten Anzahl (1×10^5) T_{eff} mitgeführt. Die Stabilität des T_{reg}-Phänotyps wurde in einem separaten Ansatz (ohne T_{eff}), der als Überlebensfaktor zusätzlich 20 U/ml IL-2 enthielt, nach vier Tagen Kultur durch Messung der Expression von CD25 und FOXP3 überprüft.

Um zu untersuchen, ob sich die suppressive Aktivität der T_{reg} spezifisch gegen *T. whipplei*-reaktive CD4⁺ T-Zellen richtet, wurde die Antwort T_{reg}-depletierter CD4⁺ (T_{eff}) und nicht depletierter CD4⁺ T-Zellen auf inaktivierte *T. whipplei* verglichen.

Hierfür wurden in Dreifachansätzen jeweils 5×10^4 CFSE-markierte T_{eff} oder CD4⁺ T-Zellen mit 1×10^4 CD4^{-low} Zellen, die Antigen präsentierende Zellen (30 ± 2 % HLA-DR⁺; Tab. 2.2) enthielten, in Anwesenheit von 10^7 /ml *T. whipplei* und 1 µg/ml anti-CD28 Antikörpern in einer Rundboden-Zellkulturplatte mit einem Volumen von je 200 µl pro Vertiefung für vier Tage inkubiert. Mit Hilfe

von Kontrollansätzen (ohne *T. whipplei*) wurde die unspezifische T-Zellaktivierung erfasst, um diese später bei der Auswertung von der spezifischen T-Zellaktivierung abziehen zu können.

Bei beiden Versuchen wurden nach vier Tagen jeweils 20 µl Kulturüberstand pro Vertiefung der Zellkulturplatte vorsichtig abgenommen und bis zur Bestimmung der Zytokinkonzentration (Kap. 2.6) bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µg/ml Brefeldin A für weitere vier Stunden Inkubationszeit, bevor Proliferation und intrazelluläres IFN-γ durchflusszytometrisch erfasst wurden.

2.5 Analytische Durchflusszytometrie

2.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (FACS, *Fluorescence activated Cell Sorting*) werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrahl hydrodynamisch vereinzelt und an einer fokussierten Laser-Lichtquelle vorbeigeführt. Das monochromatische Laserlicht (Argon $\lambda = 488$ nm oder He-Ne $\lambda = 633$ nm) wird dabei entsprechend den morphologischen Eigenschaften der Zelle gestreut und über Detektoren erfasst. Dabei gibt das in Vorwärtsrichtung gestreute Licht (FSC, *Forward Scatter*) Auskunft über die Größe der Zelle, das seitlich im rechten Winkel dazu gestreute Licht (SSC, *Sideward Scatter*) über deren Granularität. Die Auftragung von FSC gegen SSC ermöglicht somit nicht nur den Ausschluss von Zelltrümmern, sondern auch eine grobe Unterscheidung von Zelltypen innerhalb heterogener Zellpopulationen, etwa von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten im Blut. Zudem können Zellen oder zelluläre Strukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen, beispielsweise mit Fluorochromgekoppelten Antikörpern (Kap. 2.1.2), markiert werden, welche nach der Anregung durch den Laserstrahl Licht bestimmter Wellenlängen emittieren. Zur gleichzeitigen Erfassung mehrerer Parameter in einer Probe werden verschiedene Fluorochrome mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsmaxima kombiniert (Vier- oder Sieben-Farben-Analyse; Tab. 2.3), deren Signale durch Filter getrennt in separaten Detektoren bzw. Kanälen messbar sind. Da die Emissionsintensität proportional zur Menge des gebundenen fluoreszierenden Farbstoffes ist, liefert die Durchflusszytometrie neben qualitativen (% positive vs. negative Zellen) auch quantitative Aussagen (MFI, mittlere Fluoreszenzintensität).

Die Emissionsbereiche der verschiedenen Farbstoffe überschneiden sich jedoch teilweise, weswegen das Fluoreszenzsignal eines Fluorochroms nicht nur in den dafür vorgesehenen Kanal gelangt, sondern auch in den anderen Kanälen einen schwachen Impuls verursacht, den sog. *spillover*. Um Messfehler zu vermeiden, wird deshalb in jedem für einen bestimmten Farbstoff spezifischen Kanal der Signalanteil anderer Fluoreszenzfarbstoffe subtrahiert (Kompensation). In der vorliegenden Arbeit wurde diese spektrale Überlappung entweder mit Hilfe von Einzelfärbungen manuell am Gerät

korrigiert (Vier-Farben-Analyse) oder mittels *CompBeads* (BD Biosciences) automatisch kompensiert (Sieben-Farben-Analyse).

Tab. 2.3: Anregungs- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome

<i>Fluorochrom</i>	<i>Absorptions- maximum [nm]</i>	<i>Emissions- maximum [nm]</i>	<i>Farbe des emittierten Lichts</i>	<i>FACS Calibur</i>	<i>FACS Canto II</i>
Pacific Blue	401	452	blau	-	✓
CFSE	491	518	grün	✓	✓
Alexa Fluor 488	495	519	grün	✓	✓
FITC	494	520	grün	✓	✓
PE	496, 546	578	gelb	✓	✓
APC	650	660	rot	✓	✓
PE-Cy5	496, 546	667	rot	✓	✓
Alexa Fluor 647	650	668	rot	✓	✓
PerCP	482	678	rot	✓	✓
PerCP-Cy5.5	482	695	dunkelrot	✓	✓
PE-Cy7	496, 546	785	Infrarot	-	✓
APC-H7	650	785	Infrarot	-	✓

CFSE, Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; APC, Allophycocyanin; Cy, Cyanin; PerCP, Peridinin-Chlorophyll-Protein.

Um falsch-positive Fluoreszenzsignale auszuschließen wurden verschiedene Färbekontrollen mitgeführt: Erstens wurde die Stärke der Autofluoreszenz mit einer nicht markierten Zellsuspension bestimmt. Zweitens wurden die Zellen zum Ausschluss unspezifischer Antikörperbindungen mit nicht-idiotypisch bindenden Antikörpern des gleichen Isotyps aus derselben Spezies wie der interessierende Antikörper inkubiert (*Isotypkontrolle*). Drittens wurden die Zellen mit Antikörper-Mischungen gefärbt, in denen jeweils nur ein Antikörper weggelassen wurde (*Fluorescence-minus-one* (FMO)-Kontrolle), um die spektrale Überlappung zu berücksichtigen und die Grenzen zwischen Positiv und Negativ korrekt zu setzen.

Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten entweder an einem *FACS Calibur* (vier Farben) mit *CellQuest Software* oder an einem *FACSCanto II* (sieben Farben) mit *FACSDiva Software* (alle von BD Biosciences). Analysiert wurden die erhaltenen Daten mit den Auswertungsprogrammen *CellQuest Pro* (BD Biosciences) oder *FlowJo* (Tree Star, Ashland, USA).

2.5.2 Färbung von Oberflächenantigenen auf nativen Zellen

Zur Färbung von Antigenen auf der Zelloberfläche wurden die lebenden Zellen in 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf) oder Vertiefungen einer Spitzbodenplatte (Nunc) überführt, pelletiert und mit den in 50 µl Färbepuffer 1 gelösten Antikörpern für 15 min auf Eis inkubiert. Der

Färbepuffer enthielt Beriglobin (humanes polyklonales IgG; Chiron Behring), um unspezifische Bindungen der Antikörper an Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu verhindern. Nach dem Waschen in einem 5 – 10-fachen Volumen PBA wurden die gefärbten Zellen entweder zur Analyse in 200 µl PBA aufgenommen oder für eine nachfolgende Färbung intrazellulärer Proteine fixiert.

Färbepuffer 1: PBA
 2 % (v/v) Beriglobin

Für die Untersuchung von Zellpopulationen im Vollblut wurden die entsprechenden Antikörper in den jeweiligen Konzentrationen (Kap. 2.1.2) direkt zu 100 µl frischem Heparinblut in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur vor Licht geschützt inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Antikörper mit dem 10-fachen Volumen PBS durch Zentrifugation herausgewaschen und die Zellen nach dem vorsichtigen Absaugen des Überstands gründlich in 900 µl *Ix FACS Lysing* resuspendiert. Nach 15 min Einwirkzeit wurde die Lösung durch Zentrifugation (2000 xg, 5 min, 4°C) entfernt und das Zellpellet in 1 ml PBA gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden entweder zur sofortigen Analyse in 200 µl PBA aufgenommen oder für die nachfolgende Färbung intrazellulärer Proteine nachfixiert (Kap. 2.5.3).

Um kleine T-Zellsubpopulationen *in vivo* mittels Sieben-Farben-Analyse näher charakterisieren zu können, mussten die Zellen im Vollblut zunächst konzentriert werden. Dazu wurden 2 ml frisches Heparinblut in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit dem 5-fachen Volumen EL-Puffer (Qiagen, Hilden, D) vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Nach drei Waschschritten, einmal in EL-Puffer und zweimal in PBS/BSA/EDTA (PBE), wurde die Zellsuspension auf jeweils zwei 1,5 ml-Reaktionsröhrchen aufgeteilt und mit den entsprechenden Antikörpern in 100 µl PBE mit 2 % (v/v) Beriglobin für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem 10-fachen Volumen PBE gewaschen und entweder fixiert oder für die intranukleäre Färbung von FOXP3 in Fix/Perm-Puffer überführt (Kap. 2.5.4).

PBE: PBS pH 7,2
 0,5 % (w/v) BSA
 5 mM EDTA

Die Waschschriffe erfolgten entweder in der Zentrifuge *Biofuge fresco* (für Reaktionsgefäße) oder *Megafuge 1.0R* (für Kulturplatten) von der Fa. Heraeus.

2.5.3 Fixierung von Zellen

Um die Zellen für die Analyse zu einem späteren Zeitpunkt aufzubewahren oder um die Zellintegrität während des Permeabilisierungsvorgangs bei der Färbung intrazellulärer Proteine zu erhalten, wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA)-Lösung für 10 min bei 37°C fixiert und anschließend mit dem 10-fachen Volumen PBA gewaschen.

Alternativ wurden die Zellen für eine langsamere und schonendere Fixierung in 1x *CellFIX*-Lösung überführt und darin bis zur Messung bei 4°C gelagert.

Im Gegensatz zu nativen Zellen erfolgten bei fixierten Zellen alle Zentrifugationsschritte bei 2000 xg für 5 min. Fixierte Zellen wurden innerhalb der nächsten 24 - 48 h durchflusszytometrisch analysiert.

4 % PFA-Lösung: PBS pH 7,2
 4 % (w/v) PFA

1x *CellFIX*-Lösung: Aq. dest.
 10 % (v/v) 10x *CellFIX*TM

PFA wurde von Sigma-Aldrich und *CellFIX*TM von BD Biosciences bezogen.

2.5.4 Färbung intrazellulärer Proteine in fixierter Zellen

Zur Detektion intrazellulärer Proteine, wie z.B. DC-LAMP, oder von mittels Brefeldin A bzw. Monensin intrazellulär angereicherten Zytokinen war es notwendig, die Zellmembran für den Durchtritt der Antikörper mit Hilfe des Detergens Saponin (Sigma-Aldrich) reversibel zu perforieren [376]. Dazu wurden die entsprechenden Antikörper in 50 µl Saponin-haltigem Färbepuffer 2 zu den fixierten Zellen gegeben. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss, wurden die Zellen im 10-fachen Volumen PBA gewaschen und zur durchflusszytometrischen Analyse in 200 µl PBA überführt.

Färbepuffer 2: PBA
 0,5 % (w/v) Saponin
 2 % (v/v) Beriglobin

Da die intranukleäre Färbung des Transkriptionsfaktors FOXP3 eine besonders intensive Permeabilisierung erforderte, wurde das *FoxP3 Staining Set* von eBioscience verwendet. Hierfür wurden die nativen Zellen in 500 µl Fix/Perm-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift in PBA wurden die fixierten und permeabilisierten Zellen mit dem in

Färbepuffer-3 gelösten anti-FOXP3-Antikörper für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Zellen im 10-fachen Volumen Perm-Puffer gewaschen und in 1x CellFIX-Lösung überführt.

Fix/Perm-Puffer: 250 µl 4x Fixation/Permeabilization Concentrate
750 µl Fixation/Permeabilization Diluent

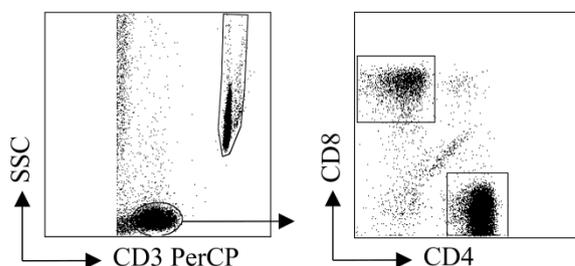
1x Perm-Puffer: Aq. dest.
10 % (v/v) 10x Permeabilization Buffer

Färbepuffer-3: 1x Perm-Puffer
2 % (v/v) Rattenserum

2.5.5 Quantifizierung der T-Zellsubpopulationen im Blut

Zur Quantifizierung der T-Zellsubpopulationen im Vollblut wurden *Trucount*-Röhrchen (BD Biosciences) verwendet. Diese beinhalten eine definierte Anzahl Mikropartikel, die sich aufgrund ihrer Größe und starken Fluoreszenz eindeutig von Zellen unterscheiden. In diesen Röhrchen wurden 50 µl Vollblut mit der Antikörperlösung, bestehend aus anti-CD3-PerCP, anti-CD4-PE und anti-CD8-FITC, für 15 min bei Raumtemperatur vor Licht geschützt inkubiert. Nach der Lyse der Erythrozyten durch Zugabe von 450 µl 1x *FACS-Lysing* für weitere 15 min wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 2.1). Die Anzahl von T-Zellen in einem Mikroliter Blut ließ sich wie folgt berechnen:

$$\frac{\text{gemessene Anzahl Zellen}}{\text{gemessene Anzahl Mikropartikel}} \times \frac{\text{Gesamtzahl Mikropartikel}}{\text{Messvolumen}} = \text{T-Zellzahl} / \mu\text{l Blut}$$



	gemessene Anzahl	% in T-Zellen	Zellen/µl Blut
Partikel	14985		
CD3	14817	100	1032
CD4		79,5	820
CD8		15,4	159

Gesamtanzahl der Partikel im Röhrchen: 52179

Abb. 2.1: Auswertungsbeispiel einer *Trucount*-Analyse

Anhand des Produkts aus der Mikropartikelzahl pro 50 µl Blut und der tatsächlich gemessenen Anzahl an CD3⁺ Zellen pro ca. 15000 Mikropartikel wurde die Absolutzahl der T-Zellen pro µl Blut berechnet. Analog wurde die absolute Anzahl von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen in der CD3⁺ Population bestimmt.

2.5.6 Analyse von DC-Subpopulationen im Blut

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Strategien verwendet, um die jeweiligen Anteile verschiedener DC-Subpopulationen im peripheren Blut zu bestimmen (Tab. 2.4).

Tab. 2.4: Eingrenzung von DC-Subpopulationen im Blut

	M-DC	M-DC1	M-DC2	slanDC	P-DC
<i>in PBMC:</i>	BDCA-2 ⁻	CD1c ⁺	CD1c ⁻		CD1c ⁻ BDCA-2 ⁺ CD141 ⁺
<i>im Vollblut:</i>	CD11c ⁺ CD123 ^{-/low}	CD141 ⁺	CD141 ⁺⁺	M-DC8 ⁺ CD16 ^{low/med}	CD11c ⁻ CD123 ^{high}

Je nach verwendetem Ausgangsmaterial (PBMC oder Vollblut) wurden die DC-Subpopulationen über verschiedene Oberflächenantigene identifiziert.

Quantifizierung von P-DC, M-DC1 und M-DC2 in PBMC

Die Quantifizierung von myeloiden DC (M-DC) vom Typ 1 und 2 sowie plasmazytoiden DC (P-DC) im peripheren Blut erfolgte mit Hilfe des *Blood Dendritic Cell Enumeration Kit* von der Fa. Miltenyi Biotec. Dafür wurden jeweils 1×10^6 frisch isolierte PBMC (Kap. 2.2.2) in 300 μ l PBA mit 2 % (v/v) Beriglobin in zwei Rundboden-Polystyrolröhrchen (FACS-Röhrchen) überführt. In ein Röhrchen wurden 20 μ l *Anti-BDCA Cocktail* (Miltenyi Biotec) zugegeben, eine Mischung aus anti-BDCA-1 (CD1c), anti-BDCA-2 (CD303) und anti-BDCA-3 (CD141) sowie anti-CD14 und anti-CD19 Antikörpern (Kap. 2.1.2). Das andere Röhrchen erhielt 20 μ l *Control Cocktail* (Miltenyi Biotec), in dem neben Antikörpern gegen CD14 und CD19 auch die entsprechenden Isotypkontrollen für die verwendeten anti-BDCA-Antikörper enthalten waren. Zusätzlich wurden beide Röhrchen mit je 10 μ l *Dead Cell Discriminator* (Miltenyi Biotec) befüllt. Dieses Reagenz enthielt einen nicht membrangängigen photoaffinen Fluoreszenzfarbstoff, der selektiv tote Zellen markiert. Dazu war es erforderlich, die Färbung in transparenten Röhrchen mit Deckel auf Eis liegend und unter Bestrahlung mit einer 60 Watt-Lampe durchzuführen, um durch Photolyse eine kovalente Bindung des Farbstoffs an Nukleinsäuren in Zellen mit zerstörten Membranen zu ermöglichen. Nach 10 min wurden die Zellen im zehnfachen Volumen PBA gewaschen und in 150 μ l PBA resuspendiert. Zur abschließenden Fixierung wurden 75 μ l *Fix Solution* mit 2,5 μ l *Discriminator Stop Reagent* (beide von Miltenyi Biotec) zur Zellsuspension gegeben, um die Färbung bis zur Messung innerhalb der nächsten 24 h zu stabilisieren.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurden zum einen Granulozyten anhand ihres starken SSC-Signals ausgegrenzt. Zum anderen konnte der *Dead Cell Discriminator*-Farbstoff, aufgrund seines

Emissionsmaximums von 625 nm, zusammen mit den PE-Cy5 gekoppelten Antikörpern gegen CD14 und CD19 genutzt werden, um tote und nicht gewünschte Zellen wie Monozyten und B-Lymphozyten im Fluoreszenzkanal (FL)-3 auszuschließen. Anhand der Expression von BDCA-2, CD1c und CD141 wurden schließlich P-DC, M-DC1 und M-DC2 unterschieden (Tab. 2.4) [47].

Charakterisierung von P-DC und M-DC im Vollblut

Im Vollblut wurden zunächst alle CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 und CD56 exprimierenden Zellen mit Hilfe des *Lineage-1 (Lin-1)* Antikörper-Cocktails (Kap. 2.1.2) von der durchflusszytometrischen Analyse ausgeschlossen. Die DC wurden anhand ihrer starken HLA-DR Expression eingegrenzt und mit Antikörpern gegen CD11c und CD123 weiter in CD11c⁺ M-DC und CD123⁺ P-DC unterteilt (Tab. 2.4; [377, 378]). Als Sonderform der M-DC wurden die eng mit den CD16⁺ CD14^{low} Monozyten verwandten slanDC über deren charakteristische Expression von M-DC8 (6-sulfo-LacNAc), einer Kohlenhydrat-Modifikation des P-Selektin-Glykoprotein-Liganden-1, identifiziert (Tab. 2.4) [40].

2.6 Quantifizierung von Zytokinen mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

Bei einem *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wird ein bestimmtes Zytokin im Zellkulturüberstand durch zwei Antikörper nachgewiesen, die spezifisch an verschiedene Epitope des Zytokins binden. Mit dem ersten immobilisierten (*capture-*) Antikörper wird das Zytokin an den Boden einer Mikrotiterplatte gekoppelt. Über den zweiten biotinylierten (*detection-*) Antikörper kann ein Avidin-Enzym-Konjugat binden, das über die Farbreaktion mit einem Substrat schließlich den Nachweis des Zytokins ermöglicht [379, 380].

Die Bestimmung der Konzentration bestimmter Zytokine in Zellkulturüberständen von Mo-DC (Kap. 2.2.7) und T-Zell-Kokulturen (Kap. 2.4.4) erfolgte mit Hilfe kommerziell erhältlicher ELISA-Kits nach den Angaben der Hersteller:

<i>Name</i>	<i>Sensitivität</i>	<i>Standardbereich</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Human IL-12p70 ELISA	2 pg/ml	5 – 320 pg/ml	U-CyTech, Utrecht, NL
Human IL-12 (p40) ELISA <i>OptEIA™</i>	3,9 pg/ml	31,3 – 2000 pg/ml	BD Biosciences, Heidelberg, D
Human IL-10 ELISA <i>Ready-SET-Go!®</i>	2 pg/ml	2 – 300 pg/ml	eBioscience, Frankfurt, D
Human IL-23 ELISA <i>Ready-SET-Go!®</i>	15 pg/ml	15 – 2000 pg/ml	eBioscience
Human IL-17A ELISA <i>Ready-SET-Go!®</i>	4 pg/ml	4 – 500 pg/ml	eBioscience

Für alle Versuche wurden Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Corning Costar 9018; Corning, Acton, USA) verwendet, die während der Inkubationszeiten mit Klebefolie und Parafilm (Pechiney

Plastic Packaging, Chicago, USA) verschlossen wurden. Soweit nicht anders vermerkt, wurden Antikörper und Enzyme entweder in *1x Assay Diluent* (IL-10, IL-23, IL-17A und IL-12p40 ELISA) oder PBST-B (IL-12p70 ELISA) verdünnt und alle Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Zum Waschen wurde PBST Puffer verwendet, der mit einer Spritzflasche über die Platten verteilt und nach 1 min Einwirkzeit ausgekippt wurde. In der Regel wurde der Waschvorgang fünfmal (nach der Einwirkung des Enzyms siebenmal) wiederholt und die Platte anschließend auf einem Papiertuch abgeklopft.

Zur Immobilisierung wurde der entsprechende *Capture*-Antikörper in *1x Coating*-Puffer (IL-10, IL-23, IL-17A und IL-12p40 ELISA) oder PBS (IL-12p70 ELISA) verdünnt und in einem Volumen von je 100 µl in einer Mikrotiterplatte über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit je 200 µl *1x Assay diluent* (IL-10, IL-23, IL-17A und IL-12p40 ELISA) oder Blockierungslösung (IL-12p70 ELISA) befüllt und so für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. In der Zwischenzeit wurde eine Standardreihe mit bekannter Zytokin-Konzentration vorbereitet, welche eine Quantifizierung der Zytokine im Zellkulturüberstand ermöglichte. Dazu wurde der jeweilige Standard entweder in *1x Assay Diluent* (IL-10, IL-17A und IL-12p40 ELISA), *Sample Diluent A* (IL-23 ELISA) oder PBST-B (IL-12p70 ELISA) seriell verdünnt. Lag die erwartete Zytokin-Konzentration oberhalb der höchsten Standard-Konzentration, wurden auch die Proben entsprechend in Puffer verdünnt. Die Mikrotiterplatte wurde gewaschen, mit je 100 µl Probe bzw. verdünntem Zytokin-Standard pro Vertiefung in Doppelansätzen befüllt und so für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schloss sich ein weiterer Waschvorgang, bevor je 100 µl des entsprechend verdünnten biotinylierten *Detection*-Antikörpers für eine Stunde zugegeben wurden. Nach dem Waschen wurden die Mikrotiterplatte mit je 100 µl des verdünnten, an Streptavidin gekoppelten Enzyms Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horse reddish peroxidase*) befüllt und so für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte gründlich gespült, bevor die an Antikörper-Enzym-Konjugate gebundenen Zytokine durch Zugabe von je 100 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat-Lösung für 15 min anhand des Farbumschlags nachgewiesen werden konnten. Dabei war die Farbintensität proportional zur Konzentration des gebundenen Zytokins. Mit der Zugabe von je 50 µl 2N H₂SO₄ (Sigma-Aldrich) wurde die Farbreaktion durch Denaturierung des Enzyms abgestoppt und der instabile blaue Farbkomplex infolge der Protonierung in einen stabilen gelben Komplex konvertiert. Die Messung der optischen Dichte (OD), als Maß für die Absorption, erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem ELISA-Lesegerät *Sunrise*TM und dem Auswertungsprogramm *Magellan 6* (beide von TECAN, Crailsheim, D). Anhand der Standardreihe wurde eine Kalibrierungskurve erstellt, welche die Berechnung der Zytokin-Konzentration aus der gemessenen OD ermöglichte. Der OD-Wert der Blindprobe (nur Kulturmedium) wurde als Hintergrundabsorption von allen Messwerten abgezogen.

<i>1x Coating-Puffer:</i>	Aq. dest. 10 % (v/v) <i>10x Coating Buffer</i>
PBST:	PBS 0,05 % (v/v) Tween-20
PBST-B:	PBST 1 % (w/v) BSA
ELISA Blockierungslösung:	PBS 1 % (w/v) BSA
<i>1x Assay Diluent:</i>	Aq. dest. 10 % (v/v) <i>10x Assay Diluent</i>

10x Assay Diluent, *10x Coating-Puffer* und *Sample Diluent A* waren in dem Kit von der Fa. eBioscience enthalten. Tween-20 wurde von der Fa. Dako bezogen.

2.7 Mikrobiologische Methoden

2.7.1 Kultivierung von *T. whipplei*

Für die vorliegende Arbeit wurde der aus der Herzklappe eines MW-Endokarditis-Patienten isolierte *T. whipplei*-Stamm „Twist-Marseille^{TMcc} [296, 297] verwendet. Die Kultivierung von *T. whipplei* in axenischem Medium nach Renesto et al [318] erfolgte durch Dr. A. Moter am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité Berlin. Hierfür wurden die Bakterien in stehenden Kulturflaschen (Greiner bio-one) in einem Maximalvolumen von 10 ml oder 20 ml in DMEM-Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Einmal wöchentlich wurden daraus neue Kulturen im Verhältnis von 1:10 mit frischem Medium angesetzt. Sobald *T. whipplei* nach 20 – 40 Tagen eine ausreichende Dichte von 2 - 10 x 10⁸ Bakterien in der Kulturflasche erreicht hatten, wurden die Bakterien in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und entweder lebend verwendet (Kap. 2.8.1 und 2.4.2) oder bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

Die Reinheit der *T. whipplei*-Kultur wurde regelmäßig mit Hilfe *T. whipplei*-spezifischer PCR und anschließender Sequenzierung überprüft. Des Weiteren wurden mittels Blutagar-Test Kontaminationen durch hämolysierende Erregerklassen (z.B. Streptokokken) ausgeschlossen.

DMEM-Kulturmedium:	DMEM
	10 % (v/v) FCS
	4,5 g/l Glukose
	25 mM HEPES
	2 mM L-Glutamin
	1 mM Natriumpyruvat
	1x MEM-Aminosäuren (126 mg/l L-Arginin HCl, 24 mg/l L-Cystin, 42 mg/l L-Histidin HCl H ₂ O, 52 mg/l L-Isoleucin, 52 mg/l L-Leucin, 73 mg/l L-Lysin HCl, 15 mg/l L-Methionin, 32 mg/l L-Phenylalanin, 48 mg/l L-Threonin, 10 mg/l L-Tryptophan, 46 mg/l L-Valin, 36 mg/l L-Tyrosin)

DMEM wurde von Gibco/Life Technologies, 50x MEM-Aminosäuren von Biochrom, L-Glutamin und Natriumpyruvat von PAA Laboratories und Glukose von Carl Roth bezogen.

2.7.2 Herstellung von *T. whipplei*-Lysat

Zur Herstellung von *T. whipplei*-Lysat für Stimulationsversuche (Kap. 2.3, 2.4.3 und 2.4.4) wurden frische oder aufgetaute *T. whipplei* in einer Konzentration von $2 - 5 \times 10^8$ Bakterien/ml durch Erhitzen für eine Stunde bei 90 °C in einem Wasserbad inaktiviert und durch Ultraschallzerkleinerung mit einem Dispergiergerät (DIAX 900; Heidolph, Schwabach, D) für dreimal je 1 min auf Eis mechanisch aufgeschlossen. Das Bakterienlysate wurde in Aliquots bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert. Die optimale Lysat-Konzentration für Stimulationsversuche wurde für jedes neu hergestellte Lysat über die T-Zellaktivierung im Vollblut ermittelt und mit der Reaktion gegen das bisher verwendete Lysat abgeglichen.

2.7.3 Endotoxin-Nachweis mittels *Limulus* Amöbozyten-Lysat-Test

Um pro-inflammatorische Effekte infolge einer Kontamination mit Endotoxinen auszuschließen, wurde das hergestellte *T. whipplei*-Lysat (Kap. 2.7.2) mit Hilfe des *Limulus* Amöbozyten-Lysat (LAL)-Tests *Endosafe*[®] von Charles River (Sulzfeld, D) auf Endotoxin-Verunreinigungen überprüft. Das LAL-Testsystem beruht auf der Eigenschaft der Blutzellen (Amöbozyten) des Pfeilschwanzkrebse *Limulus polyphemus*, bei Kontakt mit bakteriellen Endotoxinen zu koagulieren. Zunächst wurden die Testproben und die mit LAL beschichteten Glasgefäße auf Raumtemperatur gebracht. Als Positivkontrolle diente LPS, das ebenso wie das *T. whipplei*-Lysat, mit Endotoxin-freiem Wasser (Charles River) in der für Versuche eingesetzten Konzentration (Kap. 2.1.4) verdünnt wurde. Reines Endotoxin-freies Wasser wurde auch als Negativkontrolle verwendet. Das im

Glasröhrchen befindliche LAL wurde mit jeweils 200 µl der entsprechenden Probenlösung rehydriert, kurz durchmischt und sofort in ein Wasserbad mit 37 °C überführt. Nach 60 min Inkubationszeit (erschütterungsfrei) erfolgte die Auswertung des Tests durch Umdrehen der Glasröhrchen. Enthielt die Probe Endotoxine, so verblieb das viskose Gel beim Umdrehen am Gefäßboden. Hingegen zeigte eine weiterhin flüssige Probenlösung ein negatives Testergebnis an. Der Endotoxingehalt des *T. whipplei*-Lysats lag unterhalb der Nachweisgrenze (< 0,03 EU).

2.8 Histologische Methoden

2.8.1 Kurzzeit-Kultur von Duodenalbiopsien mit *T. whipplei* in der Ussing-Kammer

Die Kurzzeit-Kultur von Duodenalbiopsien in der Ussing Kammer wurde von J. Friebel und Dr. M. Schumann am Institut für Klinische Physiologie an der Charité Berlin durchgeführt [381, 382]. Eine Ussing-Kammer bezeichnet einen mit Flüssigkeit durchspülten Messapparat, in den eine Epithelmembran eingespannt wird, um deren transepitheliale Transport- und Barrierefunktion *ex vivo* zu untersuchen [382].

Frisch entnommene Makrobiopsien aus dem Duodenum wurden in einer Mini-Ussing-Kammer (exponierte Fläche von 0,049 cm²) zunächst für 30 min äquilibriert. Dabei wurden serosale und mukosale Seite getrennt voneinander mit je 10 ml DMEM-Kulturmedium umspült, welches durch einen Wärmetauscher auf 37 °C geheizt und mit 95 % O₂ und 5 % CO₂ begast wurde. Danach wurde mukosal 1 ml Medium entnommen und durch 1 ml Bakteriensuspension (1 x 10⁸ lebende *T. whipplei*) ersetzt. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne *T. whipplei* mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden wurden die Biopsien einmal in Medium gewaschen und anschließend in 4 % PFA-Lösung fixiert.

2.8.2 Fixierung, Paraffineinbettung und Schneiden von Gewebeproben

Zur Fixierung wurden frisch entnommene oder Kurzzeit-kultivierte (Kap. 2.8.1) Gewebestücke für drei Stunden in 4 % PFA-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die fixierten Gewebeproben in Einbettkassetten (*Tissue-Tek® Uni-Cassette®*; Sakura Finetek, Staufen, D) positioniert und so bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C in PBS gelagert.

Die Einbettung der Gewebeproben erfolgte automatisiert über Nacht am Institut für Pathologie der Charité Berlin. Hierfür wurden die fixierten Präparate zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 % Ethanol) und in Xylol entwässert. Danach wurden die Präparate in geschmolzenes Paraffin (56 °C) überführt. Das mit Paraffin durchtränkte Gewebe wurde schließlich in Metallförmchen ausgegossen, so dass nach dem Abkühlen ein schneidbarer Paraffin-Gewebe-Block entstand.

Zum Schneiden wurden die Paraffin-Blöcke zunächst für 15 min auf einer Kälteplatte (National Lab, Mölln, D) vorgekühlt, bevor mit einem Mikrotom (2125 RT; Leica Microsystems, Wetzlar, D) 1,5-2 µm dünne Schnitte angefertigt wurden. Die Schnitte wurden zur Entfaltung kurz in ein Wasserbad mit 45 °C überführt und auf Objektträger (*SuperFrost® Plus*, Menzel-Gläser, Braunschweig, D) aufgezogen.

2.8.3 Entparaffinisierung und Antigendemaskierung von Gewebeschnitten

Zur Entparaffinisierung wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten zunächst dreimal für je 5 min in Glas-Färbekästen nach Schiefferdecker (Carl Roth) mit 98 %igem Xylol (Carl Roth) getaucht, danach für jeweils 1 min in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 % Ethanol J.T.Baker®; Mallinckrodt Baker, Griesheim, D) rehydriert und schließlich in 1x Tris-gepufferte NaCl-Lösung (TBS, *tris buffered saline*) überführt.

Eine Antigendemaskierung war erforderlich, um die infolge der Formalin-Fixierung und Paraffineinbettung entstandenen Proteinquervernetzungen, die zu Veränderungen bis hin zum Verlust antigener Bindungsstellen (Maskierung) führen können, zumindest teilweise wieder zu lösen. Zur Freilegung maskierter Epitope wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten in Citratpuffer (pH 6) in einem Schnellkochtopf (WMF, Geislingen, D) für 2 min (nach Druckaufbau) gekocht. Anschließend wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit einem Fettstift (*ImmEdge™ Pen*; Vector Laboratories, Burlingame, USA) umrandet und bis zur immunhistologischen Färbung bis zu 12 h in TBS bei 4 °C gelagert.

1x TBS : Aq. dest.
 150 mM NaCl
 50 mM Tris-HCl
 pH 7,6

Citratpuffer Aq. dest.
 0,01 M Citronensäure Monohydrat
 pH 6

TBS wurde als fertiges Pulver von Dako und Citronensäure von Carl Roth bezogen. Der pH des Citratpuffers wurde durch Zugabe von 10 M Natriumhydroxid-Lösung (NaOH; Sigma-Aldrich) und 1 N Salzsäure (HCl; Carl Roth) mit Hilfe eines pH-Meters (pH 211; HANNA Instruments, Kehl am Rhein, D) auf den Wert 6 adjustiert.

2.8.4 Immunhistologische Färbung

Mit immunhistologischen Nachweisverfahren können in einem Gewebeschnitt unter anderem Krankheitserreger wie Bakterien spezifisch nachgewiesen und Zelltypen hinsichtlich ihrer Verteilung im Gewebe untersucht werden. Hierfür wurde die ABC ((*Strept-*)*Avidin-Biotin-Complex*)-Methode eingesetzt (Abb. 2.2). Dabei wird das Zielantigen zunächst durch einen Primärantikörper erkannt und dann mit Hilfe eines biotinylierten Sekundärantikörpers detektiert, welcher sich gegen Immunglobuline (Ig) der Spezies, aus der der Primärantikörper gewonnen wurde, richtet. An den biotinylierten Sekundärantikörper bindet wiederum Streptavidin, das insgesamt vier Biotin-Bindungsstellen besitzt. Da Streptavidin über die verbleibenden drei Biotin-Bindungsstellen entweder mit biotinylierten Enzymen (Immunhistochemie) oder Fluorochromen (Immunfluoreszenz) konjugiert ist, wird die Signalstärke und damit die Sensitivität der Färbung erhöht.

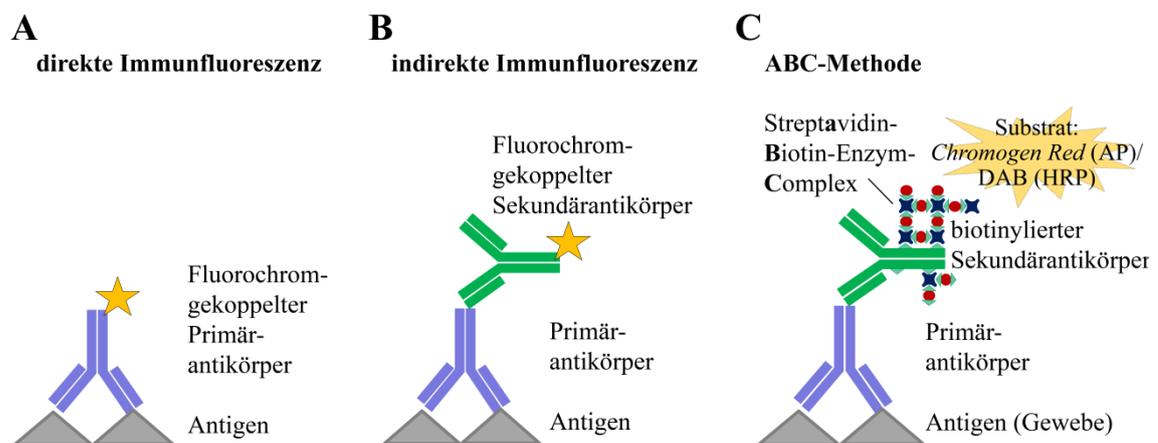


Abb. 2.2: Immunhistologische Färbemethoden

A: Antigene werden direkt durch die Bindung Fluorochrom-gekoppelter Antikörper nachgewiesen. **B:** Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung wird das Antigen durch einen spezifischen Primärantikörper erkannt, an den ein Fluorochrom-markierter Sekundärantikörper bindet, welcher sich gegen Ig der Spezies richtet, aus der der Primärantikörper gewonnen wurde. **C:** Bei der Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC)-Methode wird das Zielantigen zunächst durch einen Primärantikörper gebunden und mit Hilfe eines biotinylierten Sekundärantikörpers gegen Ig der Spezies des Primärantikörpers detektiert. An den biotinylierten Sekundärantikörper bindet wiederum Streptavidin, das vier Biotin-Bindungsstellen besitzt und über die verbleibenden drei Biotin-Bindungsstellen entweder mit Fluorochromen (Immunfluoreszenz) oder mit biotinylierten Enzymen (Immunhistochemie) konjugiert ist. Als Enzyme werden Alkalische Phosphatase (AP) oder Meerrettichperoxidase (HRP) verwendet, die ihr jeweiliges Substrat *Chromogen Red* bzw. DAB (3,3'-Diaminobenzidin) in einen roten bzw. braunen Farbstoff überführen.

Um unspezifische Färbungen durch endogenes Biotin, Biotin-bindende Proteine, Lektine oder andere unspezifische Bindungsstellen zu reduzieren, wurden die Gewebeschnitte zunächst für jeweils 15 min mit einem Streptavidin- und einem Biotin-Block (*Streptavidin/Biotin Blocking Kit*; Vector Laboratories, Burlingame, USA) und schließlich für 10 min mit einem Protein-Block (Dako, Glostrup, DK) behandelt. Zur Färbung wurden einzeln und nacheinander je 50 – 100 µl der entsprechend in *DAKO REAL™ Antibody Diluent* (Dako) verdünnten Antikörper oder Reagenzien (Kap. 2.1.2) auf die

Gewebeschnitte aufgetragen und in einer Feuchtkammer jeweils für 60 min (Primärantikörper) bzw. 30 min (biotinylierter Sekundärantikörper, Streptavidin-Konjugate) lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jeder Einwirkzeit wurden die Gewebeschnitte gründlich mit TBS-Tween (Immunhistochemie) oder TBS (Immunfluoreszenz) gespült. Bei Doppelfärbungen wurde zunächst die Färbung eines Antigens abgeschlossen, bevor die Färbung des zweiten Antigens folgte. Als Kontrollen für die Spezifität der Antikörperbindung erhielten einige Gewebsschnitte bei der Färbung entweder keinen Primärantikörper oder keinen biotinylierten Sekundärantikörper.

TBS-Tween	TBS 1x
	10 % (v/v) Tween-20

Immunhistochemische Färbung

Bei der immunhistochemischen Färbung werden die gebundenen Antikörper durch eine enzymatische Farbreaktion visualisiert (Abb. 2.2). Dazu wurden in dieser Arbeit Streptavidin-Enzym-Komplexe verwendet, die als Enzym entweder alkalische Phosphatase (AP) oder Meerrettichperoxidase (HRP) trugen. Als Substrat für AP wurde *Chromogen Red* (aus dem *Dako REAL™ Detection System*; Dako) eingesetzt (rotes Farbprodukt). Zur Herstellung der Substrat-Arbeitslösung wurden 28 Teile AP Substrat-Puffer (Flasche F) mit je einem Teil der *Chromogen Red*-Lösungen 1 (C), 2 (D) und 3 (E) der Reihenfolge nach vermischt und, je nach Intensität der Farbentwicklung, für 5 - 20 min auf dem Gewebeschnitt belassen. Für HRP wurde das Substrat DAB (3,3'-Diaminobenzidin; *SIGMAFAST™ tablets*; Sigma-Aldrich) verwendet, das zu einem braunen Farbstoff umgesetzt wurde. Dazu wurden je eine Tablette Hydrogenperoxid-Harnstoff und DAB in aq. dest. (Ampuwa® Spüllösung; Fresenius Kabi) gelöst und, je nach Intensität der Farbentwicklung, für 10 – 30 min auf dem Gewebeschnitt belassen. Um unspezifische Hintergrundfärbungen infolge endogener Peroxidasen zu minimieren, erfolgte vor Beginn der Färbung eine Vorbehandlung der Gewebeschnitte mit 3 %iger H₂O₂-Lösung. Zur Orientierung im Gewebe wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin, einem Inhaltsstoff aus Blauholz (*Haemotoxylon campechianum*) gegengefärbt. Dazu wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten in aq. dest. gewaschen und für 10 s in Mayer's Hämatoxylin (Dako) überführt. Durch das anschließende Spülen in Leitungswasser (Bläuen) nahmen die Zellkerne eine blau-violette Farbe an. Zur Einbettung der Gewebeschnitte wurde Kaiser's Glyceringelatine (Merck) kurz in der Mikrowelle verflüssigt, mit einer Pasteurpipette (Carl Roth, Karlsruhe, D) auf die Gewebeschnitte getropft und mit Deckgläschen (Menzel-Gläser, Braunschweig, D) abgedeckt. Die Auswertung erfolgte am Durchlichtmikroskop Olympus *BX41* mit der Digitalkamera *DP20* (Olympus, Tokyo, JP). Bei 400-facher Vergrößerung wurde die Anzahl der gefärbten Zellen in 10 - 20 Gesichtsfeldern bestimmt und daraus der Mittelwert berechnet. War die Abgrenzung einzelner Zellen zur Auszählung nicht möglich, wurde eine Grobeinteilung nach einem Punktesystem (histologischer *Score*) vorgenommen.

Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung basiert auf der Visualisierung der gebundenen Antikörper mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe, die an die verwendeten Sekundärantikörper bzw. das Streptavidin gekoppelt sind (Abb. 2.2).

Die unterschiedlichen Zellpopulationen im Duodenum wurden über spezifische Primärantikörper aus Maus (monoklonal) oder Kaninchen (polyklonal) und daran bindende biotinylierte anti-Maus- bzw. anti-Kaninchen-Ig-Sekundärantikörper (aus Esel) nachgewiesen und schließlich mittels Cy3-gekoppeltem Streptavidin markiert. *T. whipplei* wurde mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchen-Primärantikörpers und eines AlexaFluor488-gekoppelten anti-Kaninchen-Ig-Sekundärantikörpers (aus Esel) detektiert. Zur Orientierung im Gewebe wurde das F-Aktin-Zytoskelett der Zellen mittels AlexaFluor647-markiertem Phalloidin (Invitrogen, Karlsruhe, D), einem Phalloidin aus dem grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*), angefärbt. Dieses wurde 1:500 verdünnt, zusammen mit dem AlexaFluor488-gekoppelten anti-Kaninchen Sekundärantikörper auf den Gewebeschnitt aufgetragen und für 60 min inkubiert. Danach wurden die Zellkerne für 10 min mit DAPI (Verdünnung: 1:2000; Roche, Mannheim, D) gegengefärbt. Abschließend wurden die Gewebeschnitte in *Fluoromount-G* (Southern Biotech, Birmingham, UK) eingebettet, mit Deckgläschen abgedeckt und nach dem Trocknen bei 4 °C dunkel gelagert.

Mit Hilfe des konfokalen *Laserscanning*-Mikroskops (LSM) vom Typ 510 META und des Auswertungsprogramms *LSM 5 Image Browser* (beide von Carl Zeiss, Jena, D) wurden die Gewebeschnitte hinsichtlich der (Ko-) Lokalisation von *T. whipplei* und Antigen präsentierenden Zellen in der Lamina propria untersucht. Konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie beruht auf dem punktweisen Abrastern des zu untersuchende Präparates durch einen fokussierten Laserstrahl. Dabei wird die vom jeweils abgetasteten Probenort emittierte Fluoreszenzstrahlung hinter einer variablen Lochblende (*pinhole*) pixelweise detektiert und am Computer zu einem zweidimensionalen Bild zusammengesetzt [383]. Im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie werden dadurch Signale von Objektpunkten außerhalb der Fokusebene sowie Streulicht ausgeblendet, was zu einer Verringerung von Hintergrundsignalen und einer Erhöhung der Auflösung führt. Durch das Scannen mehrerer übereinander liegender Fokusebenen, können dreidimensionale Bilder erzeugt werden.

2.9 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Daten wurden die kommerziellen Tabellenkalkulationsprogramme *Excel* (Microsoft, München, D) und *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, La Jolla, USA) verwendet. Das jeweils eingesetzte statistische Testverfahren zur Berechnung des zweiseitigen Signifikanzwerts (p -Wert) wurde je nach Abhängigkeit der Untersuchungsgruppen, Stichprobenumfang (n), sowie Verteilung und Varianz der Daten ausgewählt. Die Prüfung der Daten auf Normalverteilung erfolgte mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests.

Um die Unterschiede zwischen unabhängigen Gruppen (z.B. MW-Patienten vs. Kontrollpersonen) zu untersuchen, wurden entweder der Mann-Whitney-U-Test (bei geringem Stichprobenumfang und nicht normalverteilten Daten), der t-Test nach Student (bei Normalverteilung und Varianzhomogenität) oder die Welch-Korrektur (bei Normalverteilung, aber Varianzheterogenität) verwendet. Die Auswertung abhängiger Daten, welche beispielsweise von demselben MW-Patienten vor und nach der Behandlung erhoben wurden, erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests (bei kleinem Stichprobenumfang und nicht normalverteilten Daten) oder des gepaarten t-Tests (bei Normalverteilung). Bei mehreren miteinander zu vergleichenden, voneinander unabhängigen Gruppen wurde zunächst eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*) durchgeführt und anschließend der Unterschied jeder Untersuchungsgruppe zur Kontrollgruppe mittels Dunnett-Test berechnet.

Die Beziehung zwischen verschiedenen Messgrößen (nicht normalverteilte Daten) wurde über die Bestimmung des Rang-Korrelationskoeffizienten (r) nach Spearman bewertet und mit Hilfe einer Regressionsgerade graphisch dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Rolle der dendritischen Zellen in der Pathogenese des Morbus Whipple

3.1.1 Subpopulationen und Phänotyp der DC im Blut von MW-Patienten

Um festzustellen, ob die DC-Population bei MW-Patienten generell oder infolge der chronischen Infektion mit *T. whipplei* verändert ist, wurden Zusammensetzung und Phänotyp der DC im Blut von MW-Patienten vor und nach Behandlung sowie von gesunden Kontrollpersonen durchflusszytometrisch untersucht und jeweils miteinander verglichen.

Zunächst wurden die Anteile von P-DC (BDCA-2⁺), M-DC1 (CD11c⁺) und M-DC2 (CD141⁺) innerhalb der mononukleären Zellen im Blut bestimmt (siehe 2.5.6). Da es aufgrund der niedrigen Frequenz von M-DC2 nicht möglich war, diese Population in einem geringen Volumen Vollblut zu detektieren, wurden hierfür PBMC verwendet. Für die späteren phänotypischen und funktionellen Analysen wurde jedoch Vollblut eingesetzt, das die *in vivo*-Situation besser repräsentiert. Im Vollblut wurden M-DC und P-DC innerhalb der *Lin-1*⁻ HLA-DR⁺ DC-Population anhand ihrer Expression von CD11c (oder CD123) identifiziert. Zudem wurde untersucht, ob der Anteil der pro-inflammatorischen M-DC8⁺ CD14^{low/-} slanDC im Blut von MW-Patienten verändert ist.

Abb. 3.1B zeigt, dass sich die Anteile der P-DC und M-DC1 innerhalb der PBMC bei MW-Patienten vor und nach Behandlung nicht signifikant von denen gesunder Kontrollpersonen unterschieden. Die Frequenz der zirkulierenden M-DC2 war jedoch bei MW-Patienten initial geringer als bei gesunden Kontrollpersonen. Im Vollblut war der Anteil der CD11c⁺ M-DC an mononukleären Zellen bei MW-Patienten initial im Vergleich zu Gesunden signifikant reduziert, während sich der Anteil der CD11c⁻ P-DC nicht zwischen den drei untersuchten Gruppen unterschied (Abb. 3.1D). Ein vergleichbares Ergebnis zeigte auch die Einteilung der DC im Vollblut anhand der Expression von CD123 in CD123^{low/-} M-DC und CD123^{high} P-DC (nicht gezeigte Daten). Der Anteil der slanDC (M-DC8⁺ CD14^{low/-}) innerhalb der mononukleären Zellen war im Blut von MW-Patienten vor und nach Behandlung im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nicht signifikant verändert (Abb. 3.1E).

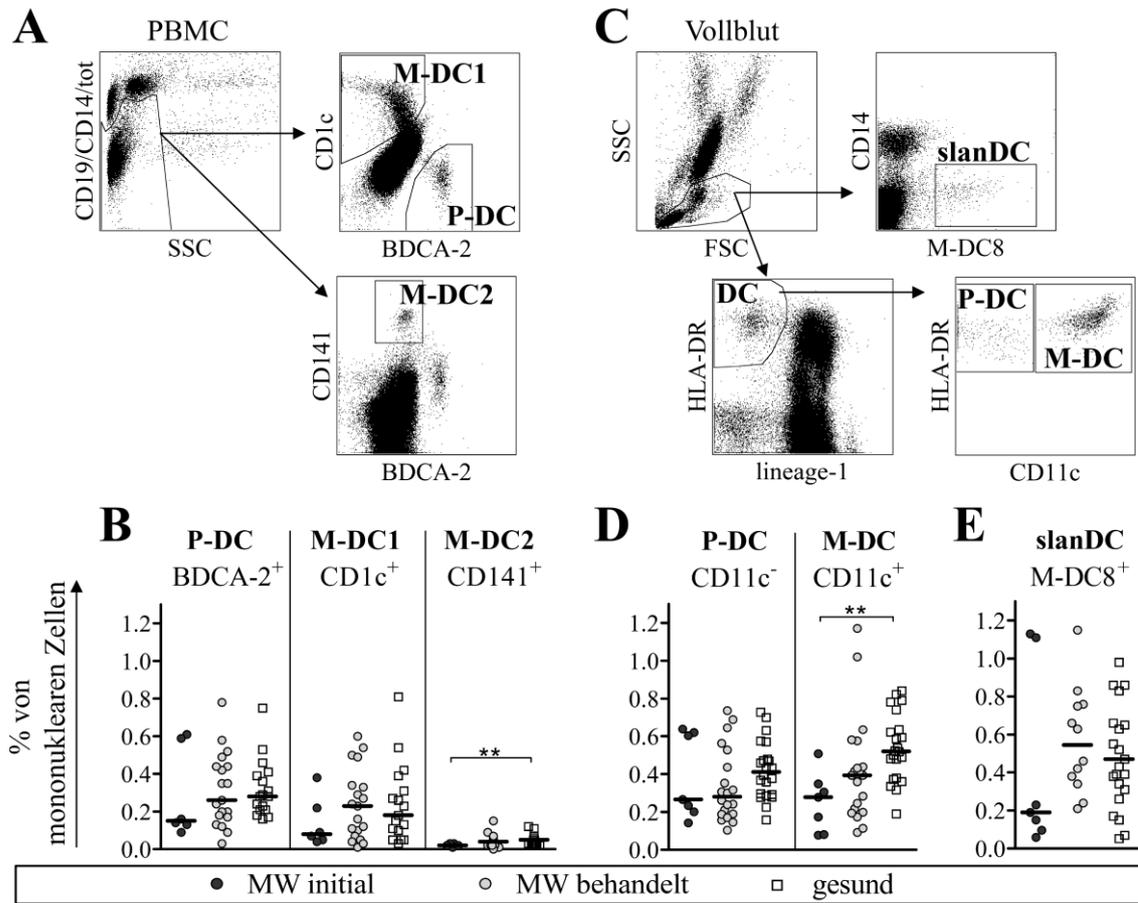


Abb. 3.1: DC-Subpopulationen im Blut von MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Die Zusammensetzung der DC-Population wurde im Blut von MW-Patienten (initial und nach Behandlung) und gesunden Kontrollpersonen durchflusszytometrisch untersucht. *A* und *C* zeigen die Analysestrategie für PBMC (*A*) und Vollblut (*C*). Zur Eingrenzung der DC-Population wurden tote Zellen und Granulozyten anhand ihrer Größe und Granularität ausgeschlossen. *B*: PBMC wurden verwendet, um die Frequenz von $\text{BDCA-2}^+ \text{CD1c}^-$ (P-DC), $\text{BDCA-2}^- \text{CD1c}^+$ (M-DC1) und $\text{BDCA-2}^- \text{CD141}^+$ (M-DC2) zu ermitteln. *D* und *E*: Im Vollblut wurden innerhalb der mononukleären Zellen die Anteile der M-DC ($\text{Lin-1}^- \text{HLA-DR}^+ \text{CD11c}^+$) und P-DC ($\text{Lin-1}^- \text{HLA-DR}^+ \text{CD11c}^-$) (*D*) sowie der Anteil der slanDC ($\text{M-DC8}^+ \text{CD14}^{\text{low}}^-$) (*E*) bestimmt. *B*, *D* und *E*: Dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte mit dem jeweiligen Median-Wert. Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests (** p-Wert < 0,01).

Um herauszufinden, ob die zirkulierenden DC in MW-Patienten phänotypisch verändert sind, wurde die Expression von Reifungsmarkern und kostimulatorischen Molekülen (CD83, CD86, CD80, CD40, PD-L1), MHC-Klasse II (HLA-DR) und Chemokinrezeptoren (CCR2, CCR5, CCR6, CCR7, CX₃CR1) auf der Oberfläche von M-DC und P-DC im Vollblut von MW-Patienten vor und nach Behandlung und gesunden Kontrollpersonen durchflusszytometrisch bestimmt.

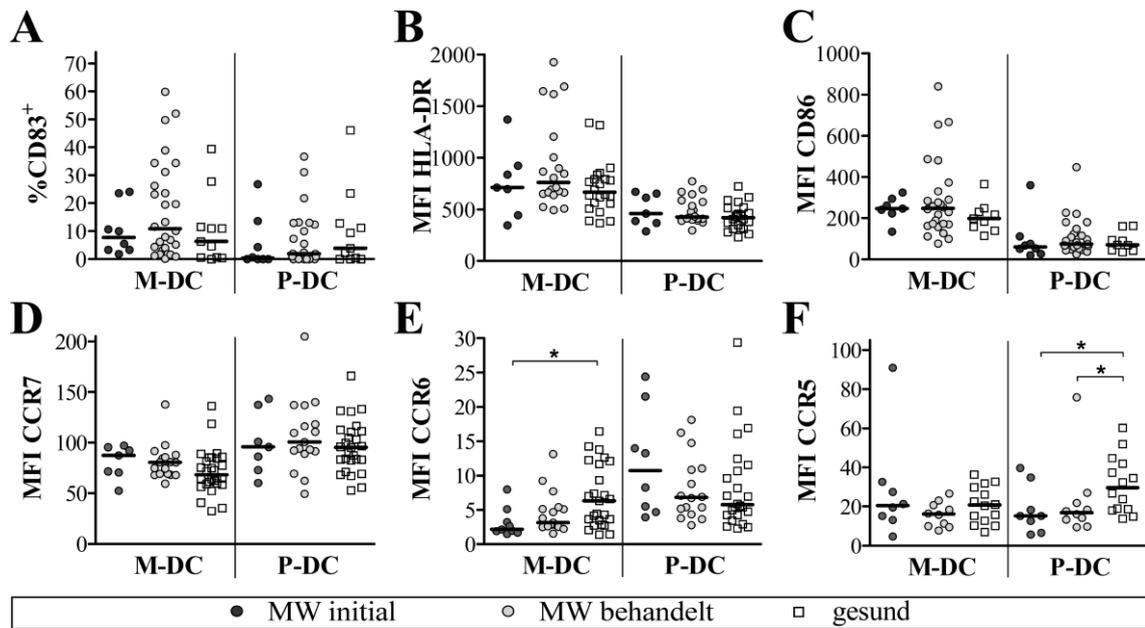


Abb. 3.2: Reifestatus der zirkulierenden M-DC und P-DC von MW-Patienten und Kontrollpersonen

Der Phänotyp der DC-Subpopulationen wurde im Blut von MW-Patienten initial und nach Behandlung sowie von gesunden Kontrollpersonen durchflusszytometrisch untersucht. Innerhalb der DC-Population ($Lin-1^-$ HLA-DR $^+$) wurden dazu M-DC (CD11c $^+$ bzw. CD123 $^{low/-}$) und P-DC (CD11c $^-$ bzw. CD123 high) unterschieden. Die Abbildung zeigt jeweils für M-DC und P-DC A: den Anteil reifer (CD83 $^+$) DC und B-F: die Oberflächenexpression von HLA-DR (B), CD86 (C), CCR7 (D), CCR6 (E) und CCR5 (F). Dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte. Der jeweilige Median-Wert ist als Linie eingezeichnet. Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests (* p-Wert < 0,05).

Die Anteile von CD83 $^+$ (reifen) DC innerhalb der M-DC und P-DC waren im Blut von MW-Patienten initial und nach Behandlung im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nicht verändert (Abb. 3.2A). Auch die Expressionsstärke von MHC-Klasse II (HLA-DR) und den kostimulatorischen Molekülen CD86, CD80, CD40 und PD-L1 auf zirkulierenden M-DC und P-DC unterschied sich nicht zwischen MW-Patienten vor und nach Behandlung und gesunden Kontrollpersonen (Abb. 3.2B, C und nicht gezeigte Daten). Die M-DC und P-DC von MW-Patienten und Kontrollpersonen wiesen ebenso eine vergleichbare Expression der Chemokinrezeptoren CCR7, CCR2 und CX $_3$ CR1 auf (Abb. 3.2D und nicht gezeigte Daten). Allerdings zeigten M-DC und P-DC von MW-Patienten eine differenziell veränderte Expression der Chemokinrezeptoren CCR6 und CCR5, welche für die Migration in die Gewebe erforderlich sind [112]: Zirkulierende M-DC von unbehandelten MW-Patienten exprimierten CCR6 auf ihrer Oberfläche schwächer als M-DC von Kontrollpersonen, während P-DC von unbehandelten und behandelten MW-Patienten eine reduzierte Oberflächenexpression von CCR5 im Vergleich zu P-DC von Kontrollpersonen aufwiesen (Abb. 3.2E, F).

MW-Patienten zeigten initial eine reduzierte M-DC-Population im Blut, allerdings war der Reifestatus der zirkulierenden M-DC und P-DC, mit Ausnahme des Chemokinrezeptorprofils, bei MW-Patienten vor und nach Behandlung im Vergleich zu Kontrollpersonen nicht signifikant verändert.

3.1.2 Aktivierbarkeit der M-DC im Blut von MW-Patienten

Da die zirkulierenden M-DC in MW-Patienten, genau wie in Gesunden, vorwiegend einen unreifen Phänotyp zeigten (Abb. 3.2), sollte untersucht werden, ob die Ausreifung und Zytokin-Produktion der M-DC im Blut von MW-Patienten und Gesunden gleichermaßen durch bakterielle Stimuli induziert werden kann.

Dazu wurden die M-DC direkt im Vollblut entweder mit LPS oder mit *T. whipplei*-Lysat für sechs Stunden stimuliert. Die Reifung der M-DC wurde anhand der Oberflächenexpression von CD83, CD86, CD40, PD-L1 und CCR7 bestimmt. Zudem wurden die Zytokine IL-12, IL-23 und IL-10 intrazellulär nachgewiesen.

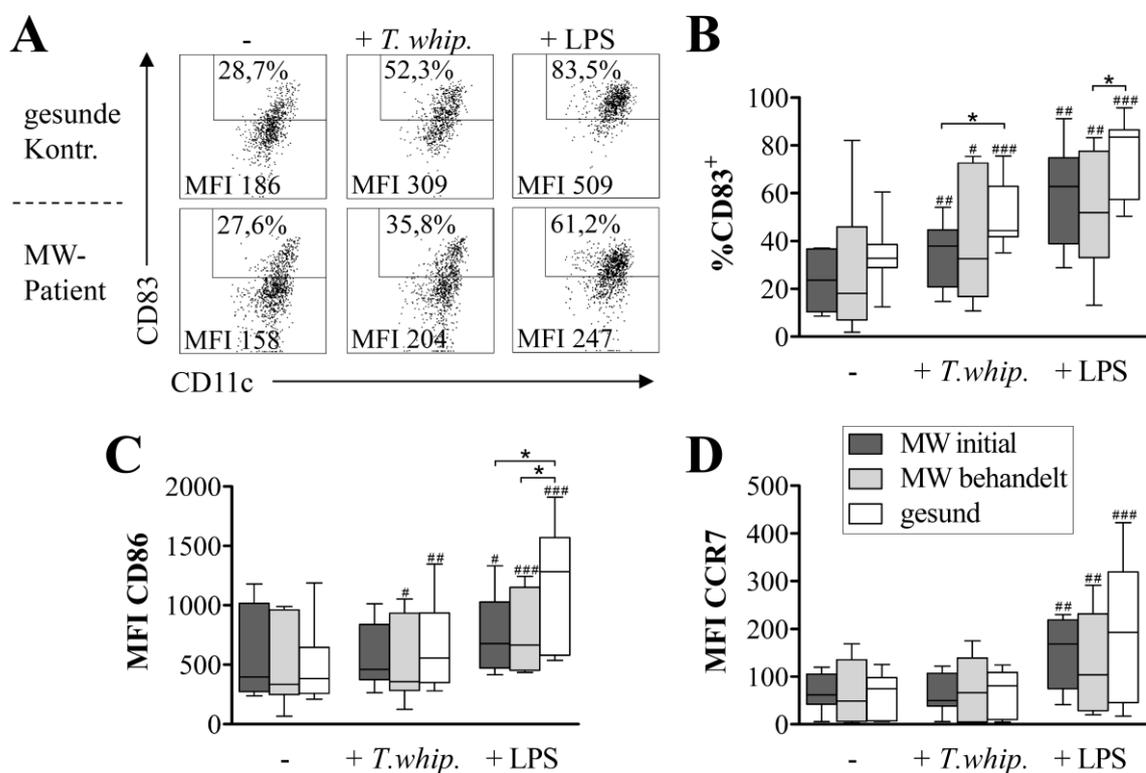


Abb. 3.3: Induktion der Reifung von M-DC *ex vivo* durch Stimulation mit LPS oder *T. whipplei*

Frisches Heparinblut von unbehandelten (initial; n=8) und behandelten MW-Patienten (n=10) sowie von gesunden Kontrollpersonen (n=16) wurde entweder ohne Stimulus (-), mit LPS (10 µg/ml) oder *T. whipplei*-Lysat (*T. whip.*; 10⁷ Bakterien/ml) für 6 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Oberflächenfärbung erfolgte direkt im Blut, vor Erythrozytenlyse und Fixierung. **A** zeigt ein repräsentatives Beispiel der durchflusszytometrischen Analyse. Eingetragen sind jeweils der prozentuale Anteil der CD83 exprimierenden Zellen und die MFI von CD83 innerhalb der M-DC (*Lin*-1⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺). **B-D**: Dargestellt sind jeweils der Median, die 25%- und 75%-Quartile sowie die beiden Extremwerte des prozentualen Anteils CD83 exprimierender Zellen (**B**) bzw. der Expressionsstärke von CD86 (**C**) und CCR7 (**D**) innerhalb der M-DC. Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests für Unterschiede zwischen gesunden Kontrollpersonen und MW-Patienten (* p-Wert < 0,05) oder des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für Veränderungen durch die Stimulanzen (LPS oder *T. whip.*) im Vergleich zum Ansatz ohne Stimulus (-) bei gepaarten Daten (# p-Wert < 0,05; ## p-Wert < 0,01; ### p-Wert < 0,001).

Die Stimulation mit dem TLR4-Liganden LPS führte bei den M-DC im Blut von MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen zur Hochregulierung des Reifemarkers CD83, der kostimulatorischen Moleküle CD86, CD40 und PD-L1 sowie des Chemokinrezeptors CCR7 auf der Zelloberfläche (Abb. 3.3 und nicht gezeigte Daten). Allerdings reagierten M-DC von MW-Patienten, unabhängig vom Behandlungsstatus, mit einer schwächeren Hochregulierung von CD83 und CD86 als M-DC von Kontrollpersonen (Abb. 3.3B, C). Die Inkubation mit *T. whipplei*-Lysat erhöhte auf den M-DC von MW-Patienten und Kontrollpersonen die Expression von CD83, CD86 und PD-L1, aber nicht von CD40 und CCR7 (Abb. 3.3 und nicht gezeigte Daten). Im Blut von unbehandelten MW-Patienten reifte infolge der Stimulation mit *T. whipplei*-Lysat jedoch ein signifikant geringerer Anteil der M-DC aus als im Blut von Kontrollpersonen (Abb. 3.3B).

Während etwa 20 % der M-DC im Blut von gesunden Kontrollpersonen nach der Stimulation mit LPS IL-12 produzierten, reagierten im Blut der MW-Patienten, unabhängig vom Behandlungsstatus, lediglich 5 % der M-DC mit einer Expression von IL-12 auf den LPS-Stimulus (Abb. 3.4A, B). Die M-DC im Blut von behandelten MW-Patienten und Kontrollpersonen, aber nicht von unbehandelten MW-Patienten, antworteten auf den LPS-Stimulus zudem mit der Expression der p19-Untereinheit von IL-23 (Abb. 3.4C, D). Interessanterweise war der Anteil der M-DC, die auf LPS mit der Expression von IL-23p19 reagierten, bei behandelten MW-Patienten signifikant höher als bei MW-Patienten vor Initiierung der Therapie (Abb. 3.4D). Die Stimulation mit *T. whipplei*-Lysat induzierte weder die Expression von IL-12(p40+p70) noch von IL-23p19 in M-DC von MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen (Abb. 3.4A-D). Der Anteil IL-10 exprimierender M-DC im Blut nahm bei MW-Patienten und Kontrollpersonen infolge der Zugabe von LPS signifikant ab (Abb. 3.4E, F). Insgesamt war der Anteil der IL-10 produzierenden M-DC im Blut von MW-Patienten und Kontrollpersonen, mit oder ohne Stimulus, vergleichbar (Abb. 3.4E, F).

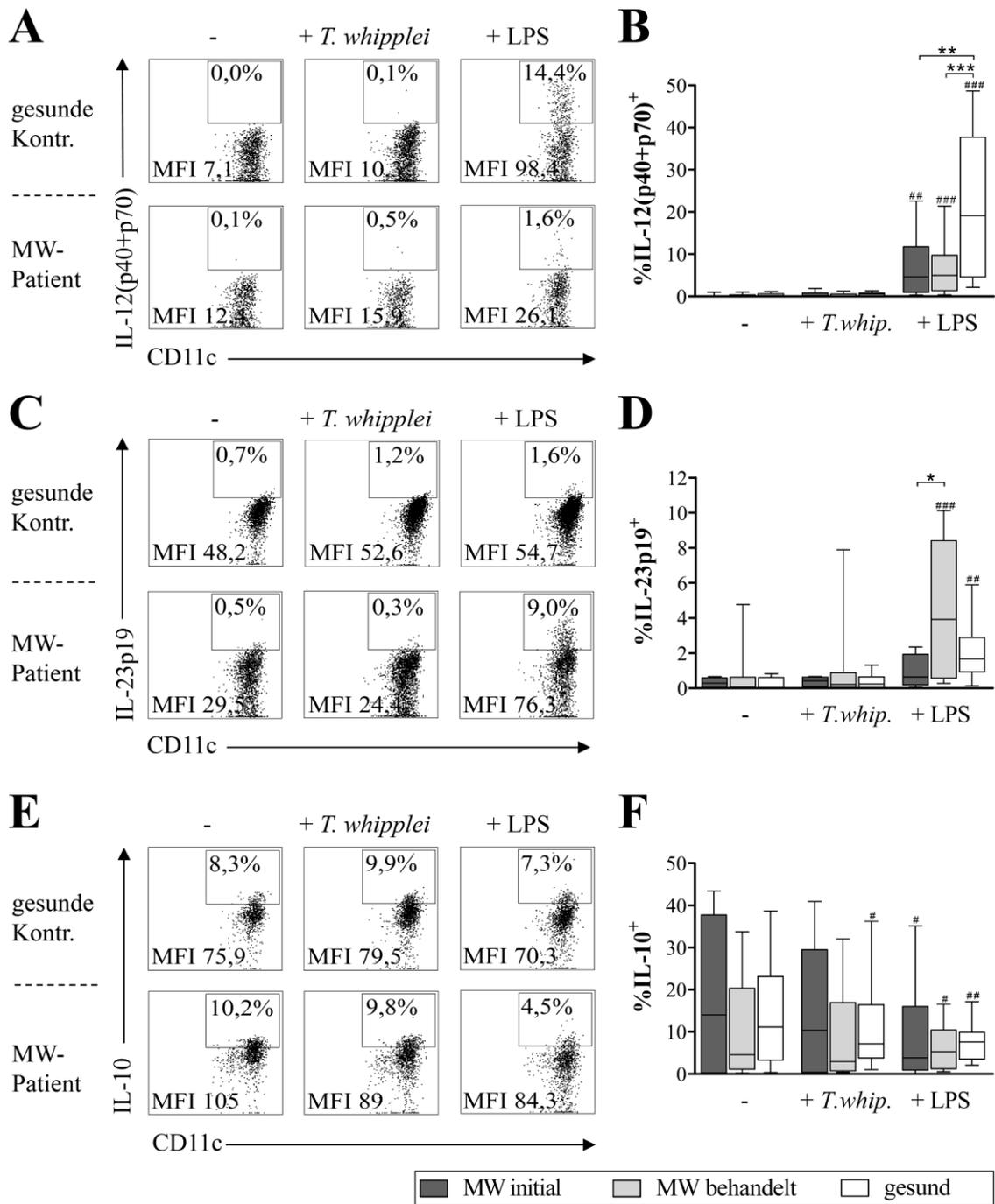


Abb. 3.4: Induktion der Zytokinproduktion in M-DC *ex vivo* durch Stimulation mit LPS oder *T. whipplei*
 Frisches Heparinblut von MW-Patienten initial (*B*: n=14, *D*: n=4, *F*: n=9) und nach Behandlung (*B*: n=44, *D*: n=12, *F*: n=23) sowie von gesunden Kontrollpersonen (*B*: n=27, *D*: n=11, *F*: n=23) wurde mit LPS (10 µg/ml), *T. whipplei*-Lysat (*T.whip.*; 10⁷ Bakterien/ml) oder ohne Stimulus (-) für 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für die letzten 3 h der Inkubationszeit wurden 10 µg/ml Brefeldin A (*A-D*) oder 1,33 µg/ml Monensin (*E,F*) zugegeben. Nach Erythrozytenlyse und Fixierung erfolgte die intrazelluläre Färbung zur Detektion der Zytokinexpression in M-DC (*Lin-1*⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺). *A,C* und *E* zeigen repräsentative Beispiele der durchflusszytometrischen Analyse für eine Kontrollperson und einen behandelten MW-Patienten. Der prozentuale Anteil der IL-12 (*A*), IL-23p19 (*C*) oder IL-10 (*E*) exprimierenden M-DC ist jeweils angegeben. *B,D* und *F*: Dargestellt sind der Median, die 25 %- und 75 %-Quartile sowie die beiden Extremwerte der Anteile von IL-12 (*B*), IL-23 (*D*) und IL-10 (*F*) exprimierenden Zellen innerhalb der M-DC. Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests für Unterschiede zwischen gesunden Kontrollpersonen und MW-Patienten (** p-Wert < 0,01; *** p-Wert < 0,001) oder des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für Veränderungen durch die Stimulanzen (LPS oder *T.whip.*) im Vergleich zum Ansatz ohne Stimulus (-) bei gepaarten Daten ([#] p-Wert < 0,05; ^{##} p-Wert < 0,01; ^{###} p-Wert < 0,001).

Da das anti-inflammatorische Zytokinmilieu in MW-Patienten für die geringe IL-12-Produktion der zirkulierenden M-DC verantwortlich sein könnte [338, 352], sollte untersucht werden, ob die Expression von IL-12 in M-DC von MW-Patienten durch eine Blockade der regulatorischen Zytokine mit anti-IL-10- oder anti-TGF- β -Antikörpern oder die Zugabe von IFN- γ auf das Normalniveau angehoben werden kann.

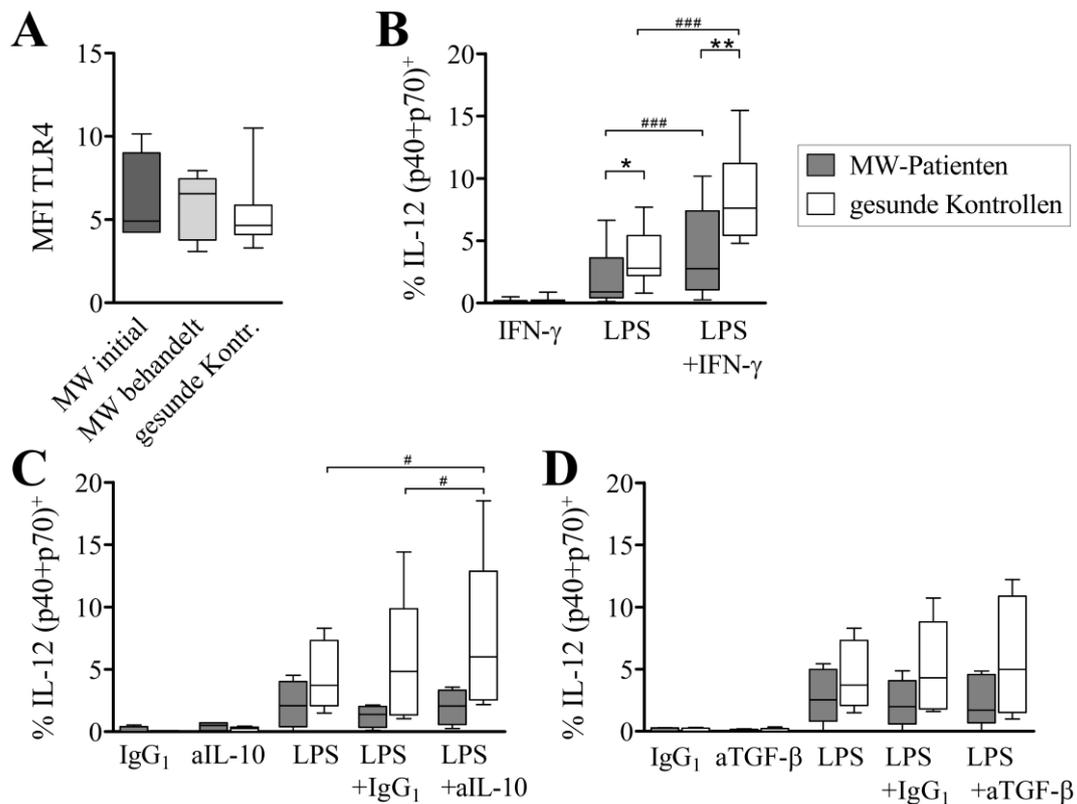


Abb. 3.5: Einfluss des Zytokinmilieus auf die IL-12-Expression der M-DC

Frisches Heparinblut von MW-Patienten initial (A: n=4) und nach Behandlung (A: n=8; B: n=15; C,D: n=5) sowie von gesunden Kontrollpersonen (A: n=13, B: n=11; C,D: n=5) wurde verwendet, um die Expression von TLR4 (A) und den Einfluss verschiedener Zytokine auf den Anteil IL-12 exprimierender Zellen (B-D) in der M-DC-Population (Lin^{-1} HLA-DR $^{+}$ CD11c $^{+}$) durchflusszytometrisch zu untersuchen. A: TLR4 wurde in unstimuliertem Vollblut durch eine Oberflächenfärbung auf M-DC nachgewiesen. B-D: Vollblut wurde mit LPS (10 μ g/ml) oder ohne Stimulus für 6 h bei 37 $^{\circ}$ C und 5 % CO $_2$ inkubiert. Für die letzten 3 h der Inkubationszeit wurden 10 μ g/ml Brefeldin A zugegeben. Nach Erythrozytenlyse und Fixierung erfolgte die intrazelluläre Färbung von IL-12. B: Einige Ansätze erhielten zusätzlich IFN- γ (20 ng/ml). C,D: Die verschiedenen Vollblut-Ansätze wurden vor Beginn der Stimulation für 1 h ohne oder mit neutralisierenden Antikörpern gegen IL-10 (2,5 μ g/ml; C) oder TGF- β (0,5 μ g/ml; D) bzw. den entsprechenden Isotypkontrollen aus Ratte (für anti-IL-10; 2,5 μ g/ml) oder Maus (für anti-TGF- β ; 0,5 μ g/ml) vorinkubiert. Dargestellt sind jeweils die Mediane, die 25 %- und 75 %-Quartile sowie die beiden Extremwerte. Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests für Unterschiede zwischen Kontrollpersonen und MW-Patienten (* p-Wert < 0,05; ** p-Wert < 0,01) oder des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für gepaarte Daten (# p-Wert < 0,05; ### p-Wert < 0,001).

Die M-DC im Blut von MW-Patienten und Kontrollpersonen unterschieden sich nicht hinsichtlich der Oberflächenexpression von TLR4 (Abb. 2.1A), weswegen ausgeschlossen werden kann, dass die verringerte Induktion von IL-12 in Reaktion auf LPS in M-DC von MW-Patienten auf einen Mangel des LPS-Erkennungsrezeptors zurückzuführen ist. Durch die Zugabe von 20 ng/ml IFN- γ zum

LPS-Stimulus erreichte der Anteil der IL-12 produzierenden M-DC im Blut von MW-Patienten das Niveau der Kontrollpersonen nach LPS-Zugabe ohne IFN- γ (Abb. 3.5B). Im Blut von Kontrollpersonen führte die Stimulation mit LPS und IFN- γ zu einer weiteren Erhöhung des Anteils IL-12-produzierender M-DC im Vergleich zur Stimulation mit LPS allein (Abb. 3.5B). Die Blockierung von IL-10 bewirkte lediglich bei M-DC im Blut von Kontrollpersonen, nicht aber von MW-Patienten, eine Steigerung der IL-12 Expression (Abb. 3.5C). Dagegen hatten anti-TGF- β -Antikörper sowohl bei MW-Patienten als auch bei gesunden Kontrollpersonen keinen Einfluss auf die durch LPS induzierte IL-12 Produktion der M-DC im Blut (Abb. 3.5D).

Die Antwortfähigkeit auf PAMP, wie den TLR4-Liganden LPS, war bei zirkulierenden M-DC von MW-Patienten generell vorhanden. Jedoch reagierten M-DC von MW-Patienten unabhängig vom Behandlungsstatus mit einer geringeren Induktion von CD83, CD86 und IL-12 als M-DC von gesunden Kontrollpersonen (Abb. 3.3B und C, Abb. 3.4A). Die reduzierte Reaktion der M-DC von MW-Patienten auf LPS war zumindest teilweise dem anti-inflammatorischen Zytokinmilieu im Blut geschuldet, da der Anteil IL-12 produzierender M-DC durch die Zugabe von IFN- γ zum LPS-Stimulus auf das Niveau der Gesunden angehoben werden konnte (Abb. 3.5B). Das *T. whipplei*-Lysat wirkte auf M-DC von Kontrollpersonen und MW-Patienten als schwacher Stimulus, der zwar eine teilweise phänotypische Reifung (Abb. 3.3), aber nicht die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-12 oder IL-23 induzierte (Abb. 3.4).

3.1.3 Phänotyp und Funktionalität aus Monozyten generierter DC von MW-Patienten

Aus Monozyten generierte DC (Mo-DC) stellen das bestmögliche *in vitro* Modell dar, um die Funktionalität von DC myeloiden Ursprungs zu untersuchen [80, 46, 369]. Denn zum einen sind im Blut weder M-DC noch CD34⁺ Vorläuferzellen (für die Differenzierung in DC) in ausreichender Anzahl verfügbar und zum anderen können Monozyten auch *in vivo* zu DC differenzieren [74, 70, 76].

Phänotyp und Zytokinproduktion der Mo-DC

Um die Möglichkeit eines intrinsischen Defekts der DC in MW-Patienten zu überprüfen, wurden DC aus Blut-Monozyten von behandelten MW-Patienten und Kontrollpersonen *in vitro* unter standardisierten Zytokinbedingungen generiert (Kap. 2.2.7) und deren Phänotyp und Funktionalität miteinander verglichen. Nach 36 Stunden Inkubation mit GM-CSF und IL-4 wurde in einem Teil der unreifen Mo-DC die Ausreifung durch Zugabe von TNF- α , IL-1 β , PGE₂ und IL-6 induziert, ein zweiter Teil der Mo-DC erhielt zusätzlich *T. whipplei*-Lysat und ein dritter Teil verblieb ohne Reifungsstimulus. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurde der Phänotyp der DC durchflusszytometrisch analysiert. Die Konzentration der Zytokine IL-12p70, IL-12p40, IL-23 und IL-10 wurde in Kulturüberständen mittels ELISA gemessen.

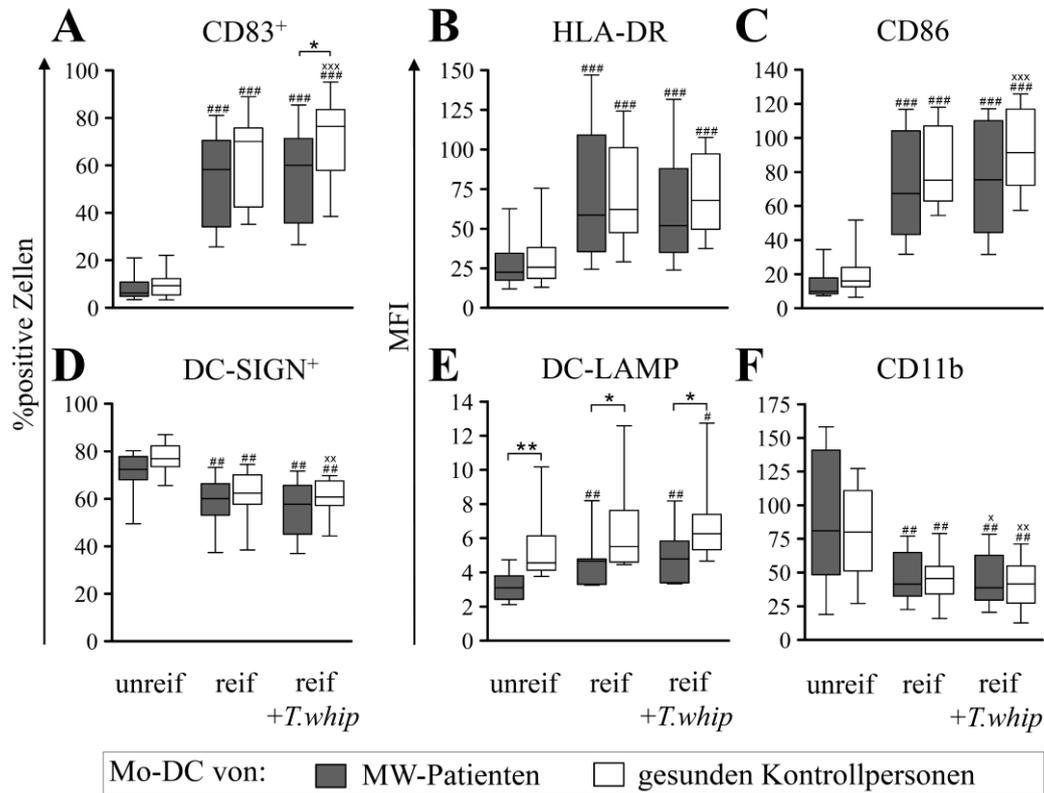


Abb. 3.6: Phänotyp der Mo-DC von MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Mittels Durchflusszytometrie wurden in unreifen Mo-DC, reifen Mo-DC und mit *T. whipplei*-Lysat (*T.whip*) inkubierten reifen Mo-DC von behandelten MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen (A-C und E: jeweils n=16; D: jeweils n=13; F: jeweils n=12) die Anteile CD83⁺ (A) und DC-SIGN⁺ (D) Zellen sowie die Expression von HLA-DR (B), CD86 (C) und CD11b (F) auf der Oberfläche und von DC-LAMP (E) intrazellulär bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Median, die 25 %- und 75 %-Interquartile und die beiden Extremwerte. Die statistische Auswertung erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests für Unterschiede zwischen Mo-DC von MW-Patienten und Kontrollpersonen (* p-Wert < 0,05; ** p-Wert < 0,01) oder des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests bei gepaarten Daten für Veränderungen des Reifungszustands zwischen den Ansätzen (reif oder reif+*T.whip*. vs. unreif: # p-Wert < 0,05; ## p-Wert < 0,01; ### p-Wert < 0,001 und reif+*T.whip* vs. reif: x p-Wert < 0,05; xx p-Wert < 0,01; xxx p-Wert < 0,001).

Phänotypisch unterschieden sich unreife und reife Mo-DC von MW-Patienten nicht von denen der gesunden Kontrollpersonen (Abb. 3.6). Sowohl MHC-Klasse II (HLA-DR), MHC-verwandte (CD1a) und kostimulatorische Moleküle (CD83, CD86, CD80, CD40, PD-L1), als auch Rezeptoren für Chemokine (CCR6, CCR7), Komplement (CD11c, CD11b), PAMP (DC-SIGN, CD14) und IgG (CD16, CD64) wurden auf der Oberfläche der unreifen und reifen Mo-DC aus MW-Patienten und Kontrollpersonen gleichermaßen exprimiert (Abb. 3.6 und nicht gezeigte Daten). Einzige Ausnahme bildete DC-LAMP, das im Zytoplasma der Mo-DC von MW-Patienten, unabhängig vom Reifegrad, signifikant geringer exprimiert wurde als in Mo-DC von gesunden Kontrollpersonen (Abb. 3.6E).

Die Zugabe von *T. whipplei*-Lysat zum Reifungsstimulus bewirkte nur in Mo-DC von gesunden Kontrollpersonen, aber nicht in Mo-DC von MW-Patienten, eine weitere Zunahme des Anteils CD83⁺ Zellen (Abb. 3.6A) und der CD86 Expression (Abb. 3.6C) sowie eine Abnahme des Anteils

DC-SIGN⁺ Zellen (Abb. 3.6D). Dagegen sank die Oberflächenexpression von CD11b infolge der Stimulation mit *T. whipplei*-Lysat bei Mo-DC von MW-Patienten und Kontrollpersonen gleichermaßen (Abb. 3.6F).

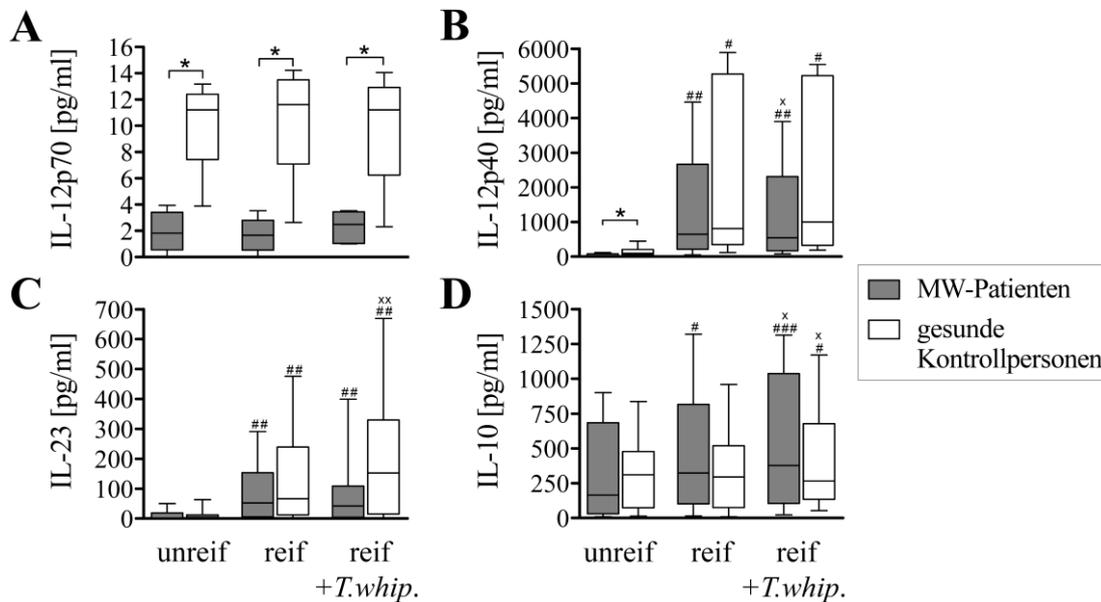


Abb. 3.7: Zytokinkonzentration in Kulturüberständen der Mo-DC von MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Die Konzentrationen von IL-12p70 (A), IL-12p40 (B), IL-23 (C) und IL-10 (D) wurden in Überständen von unreifen, reifen und mit *T. whipplei*-Lysat (*T.whip*) inkubierten reifen Mo-DC von behandelten MW-Patienten (A: MW n=5; B: n=10; C: n=17; D: n=15) und gesunden Kontrollpersonen (A: n=5; B: n=12; C: n=16; D: n=16) bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Median, die 25 %- und 75 %-Interquartile und die beiden Extremwerte der Zytokinkonzentration. Die statistische Auswertung erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests für Unterschiede zwischen Mo-DC von MW-Patienten und Kontrollpersonen (* p-Wert < 0,05) oder des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests bei gepaarten Daten für Veränderungen der Zytokinproduktion zwischen den Ansätzen (reif oder reif+*T.whip*. vs. unreif: # p-Wert < 0,05; ### p-Wert < 0,01; #### p-Wert < 0,001; reif+*T.whip* vs. reif: x p-Wert < 0,05; xx p-Wert < 0,01).

Die Mo-DC von MW-Patienten sekretierten, unabhängig von Reifungszustand und Stimulus, signifikant weniger IL-12p70 als Mo-DC von Kontrollpersonen (Abb. 3.7A). Die Konzentration von IL-12p40 im Kulturüberstand war nur bei unreifen Mo-DC aus MW-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen signifikant verringert (Abb. 3.7B). Infolge der Zugabe von *T. whipplei*-Lysat zum Zeitpunkt der Ausreifung sekretierten Mo-DC von MW-Patienten weniger IL-12p40 und Mo-DC von Kontrollpersonen verstärkte IL-23 (Abb. 3.7B, C). Die IL-10-Produktion wurde in Mo-DC von MW-Patienten und Kontrollpersonen durch die Zugabe von *T. whipplei*-Lysat gleichermaßen erhöht (Abb. 3.7D). Allerdings unterschied sich die Produktion der Zytokine IL-23 und IL-10 durch Mo-DC im unreifen und reifen Zustand, mit und ohne *T. whipplei*-Zugabe nicht signifikant zwischen MW-Patienten und Kontrollpersonen (Abb. 3.7C, D).

Die DC, die aus Monozyten von MW-Patienten *in vitro* unter optimalen Zytokinbedingungen generiert wurden, zeigten phänotypisch eine normale Reifung (Abb. 3.6), waren jedoch nicht in der Lage,

adäquate Mengen des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12p70 zu sezernieren (Abb. 3.7A). Das *T. whipplei*-Lysat hatte einen leicht verstärkenden Effekt auf die Zytokin-induzierte phänotypische Reifung und IL-23-Produktion der Mo-DC von gesunden Kontrollpersonen, nicht aber der Mo-DC von MW-Patienten (Abb. 3.7C).

Antigen-Aufnahme der Mo-DC

Eine entscheidende Voraussetzung für die Präsentation von Pathogenstrukturen ist deren Aufnahme in die Zelle. Um zu untersuchen, ob DC von MW-Patienten in der Lage sind, potentielle Pathogene aufzunehmen, wurde die Fähigkeit der unreifen Mo-DC zur Makropinozytose mit Hilfe von FITC-markierten Dextran-Partikeln bestimmt. Außerdem wurde der Einfluss der Stimulation mit *T. whipplei*-Lysat auf die Endozytosekapazität der Mo-DC untersucht.

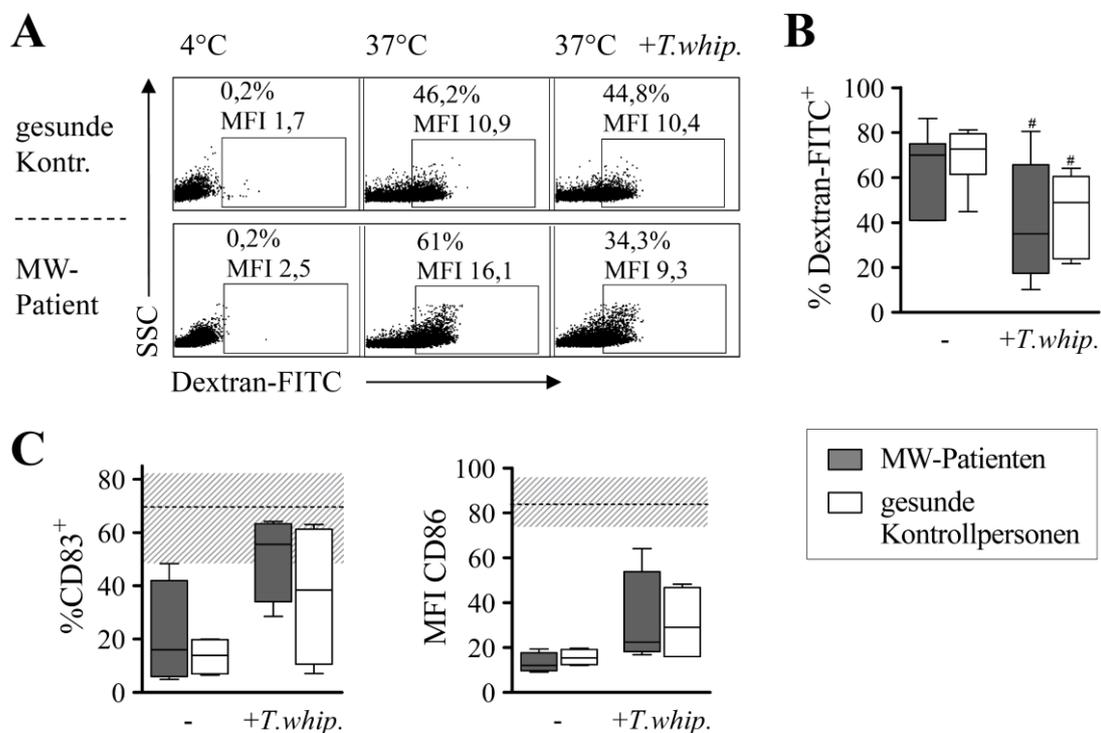


Abb. 3.8: Endozytosekapazität der unreifen Mo-DC von MW-Patienten und Kontrollpersonen

Monozyten von MW-Patienten (B: n=7; C: n=4) und gesunden Kontrollpersonen (B: n=6; C: n=4) wurden zu unreifen Mo-DC differenziert. Zu einem Teil der Ansätze wurde für die letzten 18 h Inkubationszeit *T. whipplei*-Lysat gegeben. A und B: Je 1×10^5 unreife Mo-DC wurden mit $10 \mu\text{g/ml}$ FITC-gekoppelten Dextran-Partikeln für 30 min bei 37°C (Negativkontrolle bei 4°C) inkubiert. Der Anteil der Mo-DC, die Dextran-FITC aufgenommen hatten, wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Zur Auswertung wurde der jeweilige Anteil der unspezifischen Endozytose bei 4°C abgezogen. A zeigt ein repräsentatives Beispiel der Analyse. C veranschaulicht Veränderungen infolge der Inkubation mit *T. whipplei*-Lysat hinsichtlich des Anteils CD83⁺ (reifer) Mo-DC und der Oberflächenexpression von CD86 auf Mo-DC im Vergleich zu vollständig ausgereiften Mo-DC von Kontrollpersonen (*gestrichelte Linie*: Medianwert; *schraffiertes Feld*: Bereich zwischen 25 %- und 75 %-Interquartil). B und C: Dargestellt sind jeweils der Median, die 25 %- und 75 %-Interquartile und die beiden Extremwerte des Anteils endozytischer Zellen (B) bzw. CD83 exprimierender Zellen sowie der CD86-Expression (C). B: Die statistische Auswertung erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests für Unterschiede zwischen Mo-DC von MW-Patienten und Kontrollpersonen oder des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests bei gepaarten Daten für Veränderungen der Endozytosefähigkeit durch Inkubation mit *T. whipplei*-Lysat (# p-Wert < 0,05).

Die Anteile der endozytierenden Mo-DC unterschieden sich nicht zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen. Die Vorinkubation mit *T. whipplei*-Lysat für 18 Stunden verringerte jedoch die Makropinozytose der Mo-DC von MW-Patienten und Kontrollpersonen (Abb. 3.8A, B).

Um zu untersuchen, ob die durch *T. whipplei* verringerte Endozytosekapazität der Mo-DC auf deren Ausreifung zurückzuführen war, wurde die Oberflächenexpression verschiedener Reifungsmarker auf den Mo-DC untersucht. In der Tat verstärkte die Inkubation unreifer Mo-DC von Kontrollpersonen und MW-Patienten mit *T. whipplei*-Lysat deren Expression von CD83 und CD86, welche jedoch unter dem Niveau der Expression in reifen Mo-DC blieb (Abb. 3.8C). Die durch *T. whipplei* induzierte Reifung war nicht die Folge einer LPS-Verunreinigung des Lysats, da die mittels LAL-Test (Kap. 2.7.3) bestimmte LPS-Konzentration des Lysats unter 0,03 EU/ml lag.

Um herauszufinden, ob *T. whipplei*-Bakterien von DC aus MW-Patienten *in vitro* aufgenommen werden können und in MHC-Klasse II-Kompartimente gelangen, wurden unreife Mo-DC zusammen mit lebenden *T. whipplei* in einer Ratio von 1:50 für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden Zytospins von den Mo-DC angefertigt, um darin die intrazelluläre Lokalisation von *T. whipplei* konfokalmikroskopisch zu analysieren.

Abb. 3.9 zeigt, dass *T. whipplei*-Bakterien von ca. einem Viertel der unreifen Mo-DC aufgenommen wurden. Die meisten Zellen, die *T. whipplei* internalisiert hatten, exprimierten moderate Mengen DC-SIGN (DC-SIGN^{med}) und kein DC-LAMP (Abb. 3.9D, E). Andersherum betrachtet, befanden sich in der Hälfte der DC-SIGN^{med} und in nahezu allen DC-LAMP⁺ Mo-DC *T. whipplei*-Bakterien. Dies deutet darauf hin, dass die Aufnahme von *T. whipplei* bei einigen Mo-DC eine Reifung induziert haben könnte. Da *T. whipplei* nicht direkt mit DC-SIGN kolokalisierte (Abb. 3.9A) ist unwahrscheinlich, dass *T. whipplei* über die Bindung an DC-SIGN in das Zellinnere gelangt ist. In den Mo-DC kolokalisierte *T. whipplei* teilweise mit DC-LAMP und HLA-DR (Abb. 3.9B, C) - den Markern für MHC-Klasse II-Kompartimente.

Die Endozytosekapazität der unreifen Mo-DC von MW-Patienten war im Vergleich zu Mo-DC von gesunden Kontrollpersonen nicht verändert (Abb. 3.8). Die Inkubation mit inaktivierten oder lebenden *T. whipplei* induzierte eine teilweise Reifung der Mo-DC (Abb. 3.8, Abb. 3.9). Lebende *T. whipplei* wurden von den unreifen Mo-DC aufgenommen und gelangten in Kompartimente, in denen die Beladung von MHC-Klasse II-Molekülen mit Antigenen stattfindet.

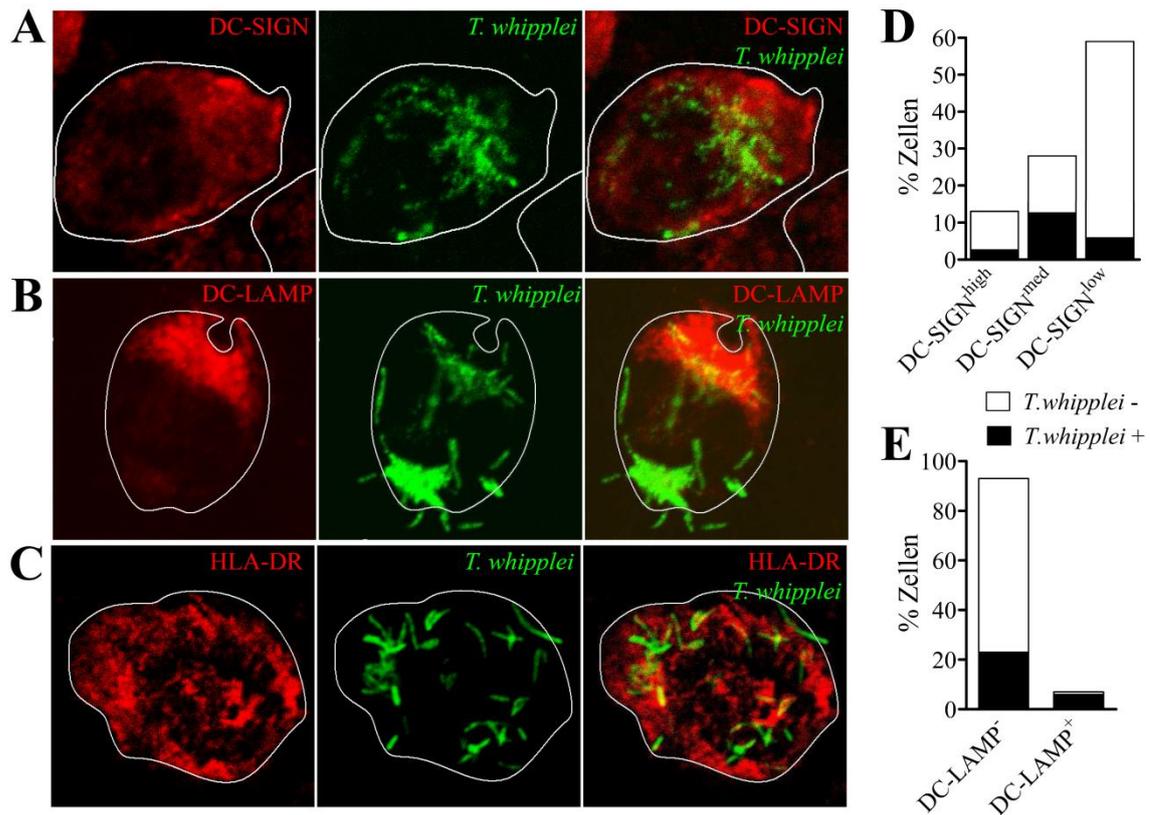


Abb. 3.9: Aufnahme und Lokalisation von *T. whipplei* in Mo-DC von MW-Patienten

Unreife Mo-DC eines MW-Patienten wurden mit lebenden *T. whipplei*-Bakterien in einer Ratio von 1:50 für 30 min inkubiert, gewaschen und auf Objektträger zentrifugiert. Mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung wurden die Bakterien (grün) und die jeweiligen Kompartimente (rot; A: DC-SIGN, B: DC-LAMP, C: HLA-DR) visualisiert und deren Lokalisation an einem konfokalen LSM analysiert. Die Zellumrisse wurden nachträglich anhand des Phasenkontrastbildes eingezeichnet. D und E: Die Anzahl (nicht apoptotischer) DC-SIGN⁺ (D) und DC-LAMP⁺ (E) Zellen sowie deren Kolokalisation mit *T. whipplei* wurde unter Zuhilfenahme der DAPI-Kernfärbung und des Phasenkontrastes jeweils in einem repräsentativen Gesichtsfeld mit mehr als 100 Zellen bestimmt.

Stimulation *T. whipplei*-spezifischer Th1-Antworten durch Mo-DC

Um zu untersuchen, ob DC von MW-Patienten das Potenzial besitzen, Antigen-spezifische T-Zellen zu aktivieren, wurden Mo-DC entweder ohne Stimulus oder in Anwesenheit von *T. whipplei*-Lysat oder Cytomegalievirus (CMV)-Antigenen für 24 Stunden ausgereift und in verschiedenen Konzentrationen zu CFSE-markierten autologen T-Zellen gegeben. Nach fünf Tagen wurden Proliferation und IFN- γ -Produktion der T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Mo-DC von MW-Patienten induzierten zwar genauso effizient wie Mo-DC von Kontrollpersonen die Proliferation und IFN- γ -Expression CMV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen, waren aber nicht in der Lage, *T. whipplei*-spezifische CD4⁺ T-Zellen zu aktivieren (Abb. 3.10).

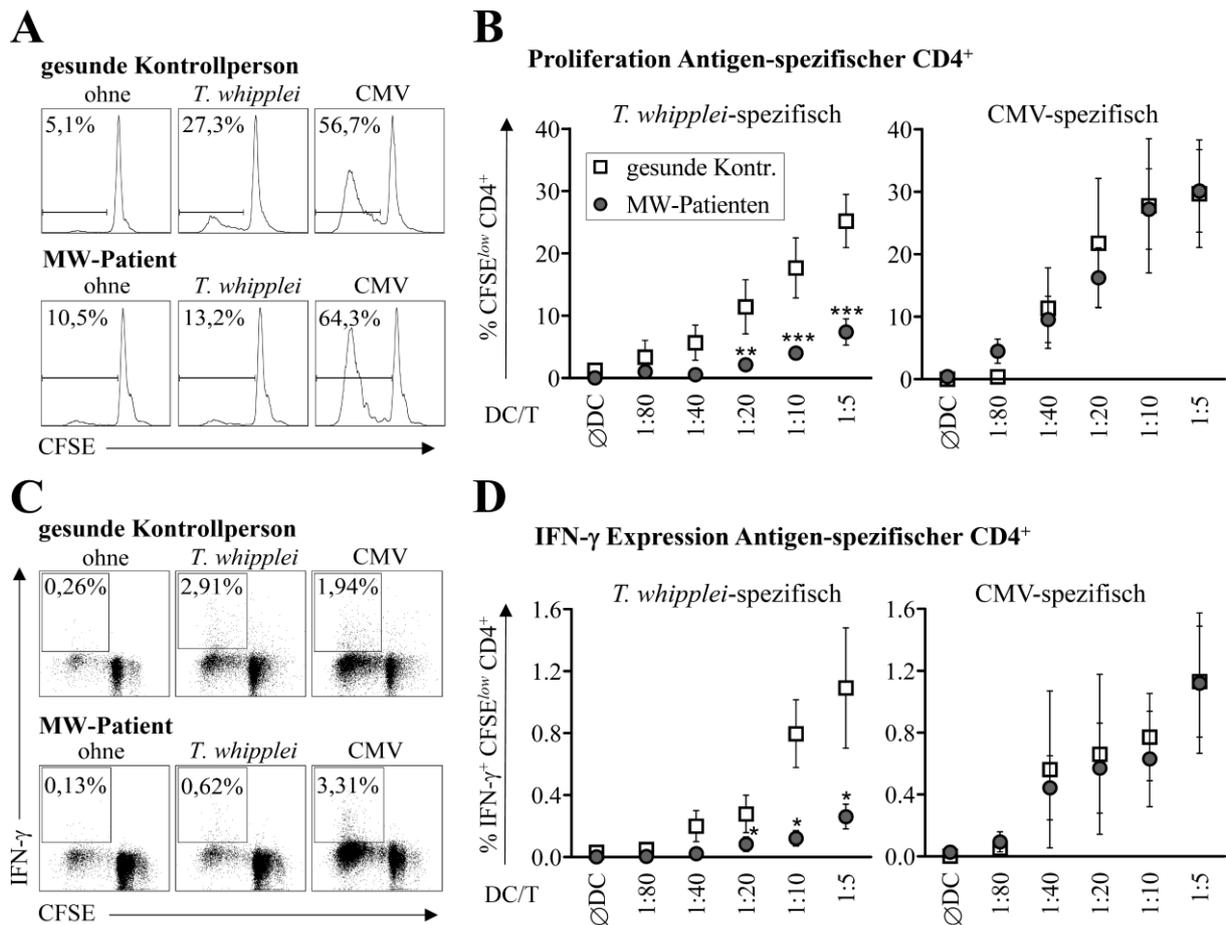


Abb. 3.10: Aktivierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen durch Mo-DC von MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Mo-DC von MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurden entweder ohne Stimulus oder in Anwesenheit von *T. whipplei*-Lysat (10^7 Bakterien/ml) oder CMV-Antigenen (1,5 $\mu\text{g/ml}$) für 24 h ausgereift und in den angegebenen Verhältnissen mit 2×10^5 CFSE-markierten autologen T-Zellen (CD14⁺HLA-DR⁺) für weitere 5 Tage inkubiert. Brefeldin A wurde 4 h vor der Fixierung und intrazellulären Färbung zugegeben. Anhand der Ausdünnung der CFSE-Fluoreszenz wurden die Anteile der proliferierenden (CFSE^{low}) Zellen (A) und der IFN- γ exprimierenden proliferierenden (IFN- γ ⁺ CFSE^{low}) Zellen (B) innerhalb der CD4⁺ CD3⁺ Population durchflusszytometrisch bestimmt. Von jedem Datenpunkt wurde der jeweilige Wert der unspezifischen Aktivierung (ohne Stimulus) abgezogen. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und SEM. Die statistische Auswertung erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests (* p-Wert < 0,05; ** p-Wert < 0,01; *** p-Wert < 0,001).

3.1.4 Einfluss von IL-16 auf Reifung und Funktion der Mo-DC

Um zu prüfen, ob IL-16 den Phänotyp und die Funktionalität der DC beeinflusst, erhielt ein Teil der Mo-DC von behandelten MW-Patienten und Kontrollpersonen während des Differenzierungsprozesses zusätzlich 10 ng/ml IL-16. Anschließend wurden die phänotypische Reifung, die Zytokinproduktion, die Endozytosekapazität und die Fähigkeit, Antigen-spezifische T-Zellen zu aktivieren durchflusszytometrisch analysiert.

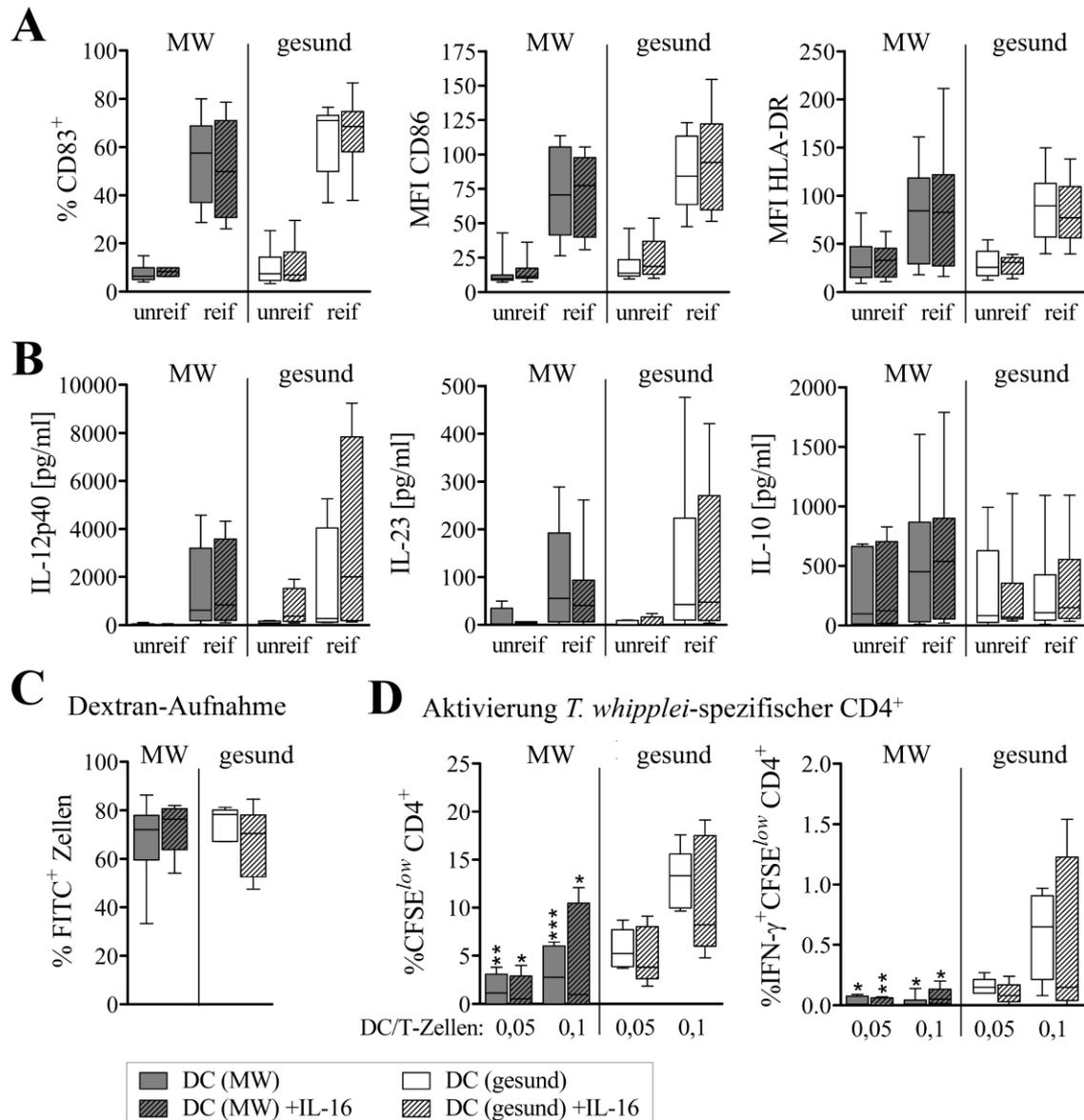


Abb. 3.11: Einfluss von IL-16 auf Phänotyp und Funktionalität der Mo-DC

Monozyten von behandelten MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen (A: MW n=11, gesund n=6; B: jeweils n=5-10; C: jeweils n=6; D: MW n=6, gesund n=5) wurden *in vitro* entweder ohne oder mit 10 ng/ml IL-16 zu Mo-DC differenziert. A: Die phänotypische Reifung wurde anhand des Anteils CD83⁺ Zellen sowie der Expression von CD86 und HLA-DR durchflusszytometrisch bestimmt. B: Die Zytokinkonzentration in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA gemessen. C: Je 1x10⁵ unreife Mo-DC wurden mit 10 μ g/ml FITC-Dextran für 30 min bei 37 °C (Negativkontrolle bei 4 °C) inkubiert. Die Anteile der Mo-DC, die Dextran aufgenommen hatten, wurden durchflusszytometrisch bestimmt, wobei der jeweilige Anteil der unspezifischen Endozytose bei 4 °C abgezogen wurde. D: Einige Mo-DC wurden mit *T. whipplei*-Lysat (10⁷ Bakterien/ml) für 24 h ausgereift und in den angegebenen Verhältnissen mit 2 x 10⁵ CFSE-markierten autologen T-Zellen für 5 Tage inkubiert. Brefeldin A wurde 4 h vor der Fixierung und intrazellulären Färbung zugegeben. Anhand der Ausdünnung der CFSE-Fluoreszenz wurden die Anteile der proliferierenden (CFSE^{low}) Zellen und der IFN- γ exprimierenden proliferierenden (IFN- γ ⁺ CFSE^{low}) Zellen innerhalb der CD4⁺ CD3⁺ Population durchflusszytometrisch bestimmt. Von jedem Datenpunkt wurde der jeweilige Wert der unspezifischen Aktivierung (ohne Stimulus) abgezogen. Dargestellt sind jeweils der Median, die 25 %- und 75 %-Interquartile und die beiden Extremwerte. Die statistische Auswertung erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests für Unterschiede zwischen Kontrollpersonen und MW-Patienten (* p-Wert < 0,05; ** p-Wert < 0,01; *** p-Wert < 0,001) oder des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für gepaarte Daten (ohne vs. mit IL-16).

Abb. 3.11 zeigt, dass IL-16 keinen Einfluss auf die phänotypische Reifung, Endozytosekapazität, Zytokinproduktion und T-Zell-stimulatorische Fähigkeit der Mo-DC von MW-Patienten und Kontrollpersonen hatte.

3.1.5 Verteilung der DC in nicht-lymphatischen Geweben von MW-Patienten

DC in der duodenalen Mukosa

Um zu untersuchen, ob DC am Ort der primären *T. whipplei*-Infektion, der duodenalen Mukosa, vorhanden sind, wurden verschiedene DC-Populationen in Duodenalbiopsien von MW-Patienten und Kontrollpersonen mit unauffälligem Befund immunhistochemisch angefärbt. Da für humanes Darmgewebe kein universeller Marker spezifisch für DC existiert, wurden die insbesondere für Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Präparate bewährten Marker, DC-SIGN für aus Monozyten differenzierte DC [58, 384] und S-100 für interdigitierende DC [59, 385], verwendet. Da auch ein Teil der Makrophagen im Darm schwach DC-SIGN [57] und S-100 exprimiert [385], wurden nur diejenigen Zellen in die Analyse eingeschlossen, die eine starke Expression von DC-SIGN bzw. S-100 aufwiesen.

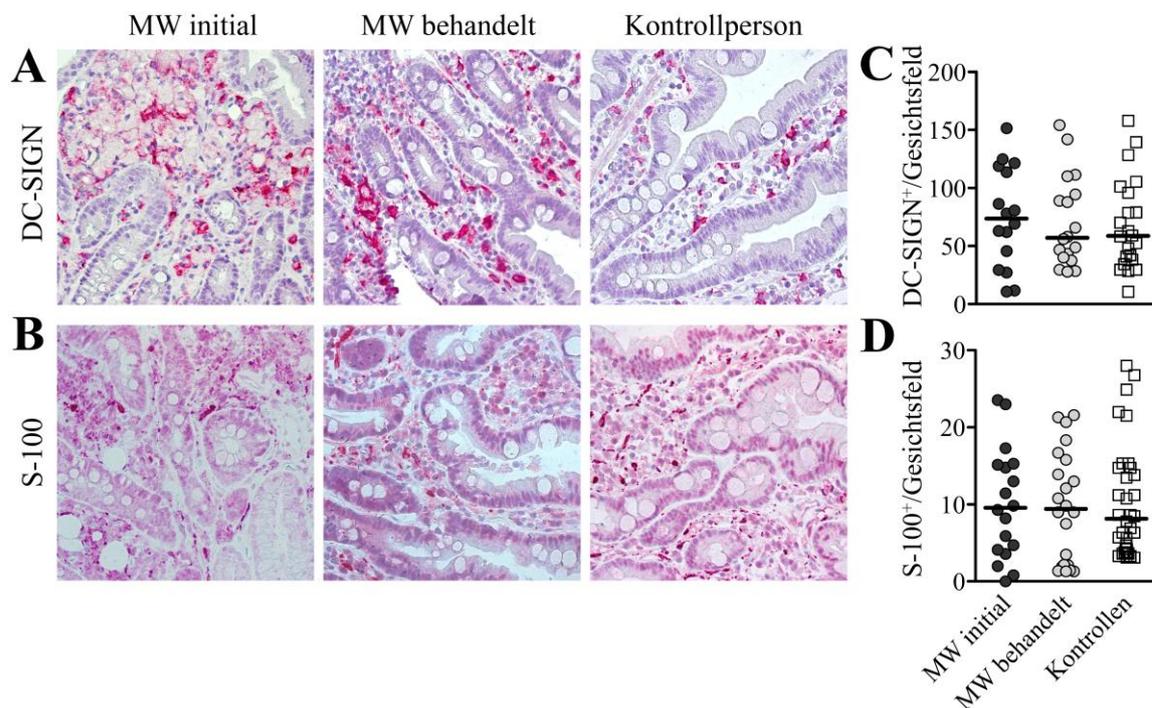


Abb. 3.12: DC-Populationen im Duodenum von MW-Patienten und Kontrollpersonen

In Duodenalbiopsien von MW-Patienten vor (initial) und nach Behandlung sowie von Kontrollpersonen mit unauffälligem Befund wurden DC-Populationen immunhistochemisch angefärbt. A,B: Repräsentative Aufnahmen zeigen die Verteilung von DC-SIGN⁺ (A) und S-100⁺ (B) Zellen (rot) in der Lamina propria. C und D zeigen die Anzahl der DC-SIGN⁺ (C) und S-100⁺ (D) Zellen in der Lamina propria pro Gesichtsfeld. Dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte und der jeweilige Median-Wert. Die statistische Analyse unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen.

Die MW-Patienten zeigten initial und nach Behandlung, ebenso wie Kontrollpersonen, eine starke Präsenz an DC-SIGN⁺ interstitiellen DC im Duodenum (Abb. 3.12A, C). Auch die Anzahl an S-100⁺ DC war im Duodenum der MW-Patienten unabhängig vom Therapiestatus im Vergleich zu Kontrollpersonen nicht verändert (Abb. 3.12B, D).

Um zu untersuchen, ob interstitielle DC auch *in situ* *T. whipplei*-Bakterien aufnehmen, wurden frisch entnommene Duodenalbiopsien von Kontrollpersonen mit unauffälligem Befund und MW-Patienten in Remission (kein *T. whipplei*-Nachweis im Darm) für drei Stunden mit 1×10^8 lebenden *T. whipplei* in einer Ussing Kammer inkubiert, anschließend fixiert und in Paraffin eingebettet. In den so behandelten Proben sowie in Duodenalbiopsien von unbehandelten MW-Patienten mit einem massiven Befall durch *T. whipplei* wurden DC-SIGN⁺ interstitielle DC und *T. whipplei* mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert und mit einem konfokalen LSM dargestellt.

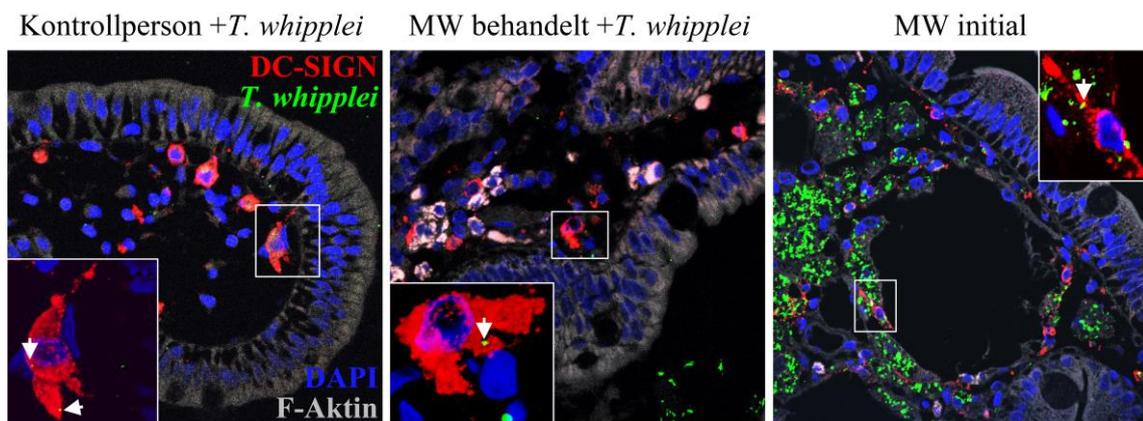


Abb. 3.13: Lokalisation von DC und *T. whipplei* im Duodenum von MW-Patienten und Kontrollpersonen

Die Immunfluoreszenzfärbung von *T. whipplei* (grün) und DC-SIGN (rot) erfolgte in Duodenalbiopsien von Kontrollpersonen (links) und MW-Patienten ohne *T. whipplei*-Nachweis im Darm (behandelt; Mitte), die *ex vivo* in einer Ussing-Kammer für 3 h mit 1×10^8 lebenden *T. whipplei* inkubiert wurden sowie von unbehandelten MW-Patienten mit massivem Befall durch *T. whipplei* (initial; rechts). Zur Orientierung im Gewebe wurden das F-Aktin-Zytoskelett mit Phalloidin (hellgrau) und die DNA in den Zellkernen mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Lokalisation von DC-SIGN⁺ Zellen und *T. whipplei* wurde mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie bei 630-facher Vergrößerung analysiert. In vergrößerten Ausschnitten sind einzelne Zellen dreidimensional (links und Mitte) dargestellt (ohne Aktinfärbung). Pfeile zeigen die Lokalisation von *T. whipplei* innerhalb der Zelle.

In Duodenalbiopsien von Kontrollpersonen und behandelten MW-Patienten hatte *T. whipplei* das Epithel durchdrungen und war in der Lamina propria sowohl extrazellulär als auch in DC-SIGN⁺ Zellen nachweisbar (Abb. 3.13). Die DC-SIGN⁺ Zellen befanden sich meist unter der Epithelschicht und waren besonders zahlreich in der Nähe der Krypten vertreten. Ebenso zeigten MW-Patienten initial, neben der massiven Infiltration von vergrößerten, prall mit *T. whipplei* gefüllten Makrophagen, auch DC-SIGN⁺ Zellen mit einzelnen intrazellulären *T. whipplei*-Bakterien in der Lamina propria (Abb. 3.13).

DC in peripheren Geweben von MW-Patienten

Um zu untersuchen, ob *T. whipplei* infolge der systemischen Infektion auch in peripheren Geweben mit DC kolokalisiert, wurden Biopsien aus der Haut und der entzündeten Synovialmembran von unbehandelten MW-Patienten immunhistochemisch analysiert.

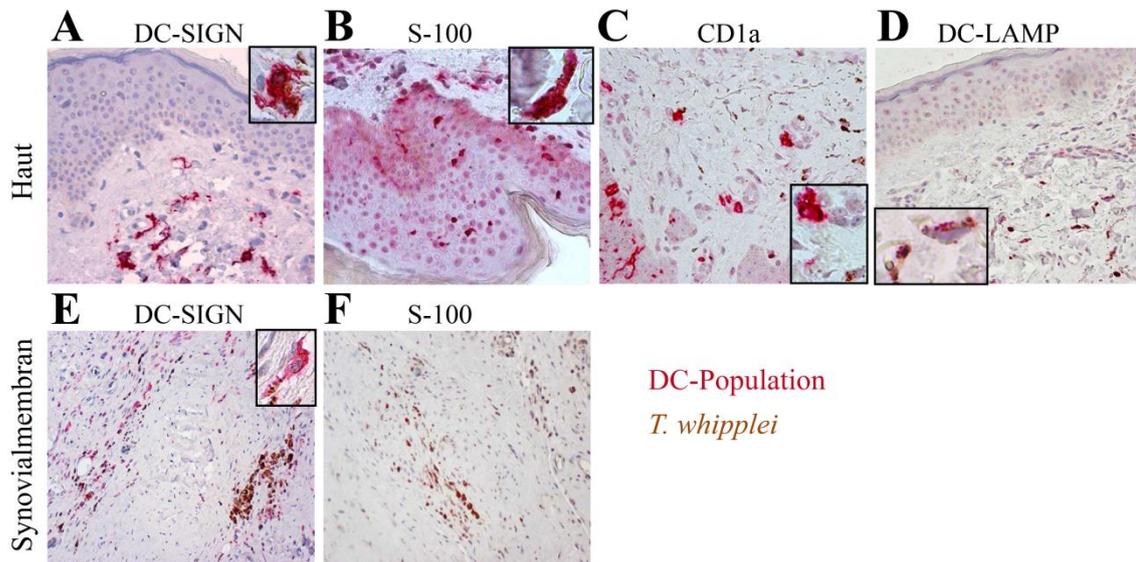


Abb. 3.14: DC-Populationen und *T. whipplei* in Haut und Synovialmembran von MW-Patienten

Verschiedene DC-Populationen (rot) und *T. whipplei* (braun) wurden in Hautbiopsien (A-D) und Synovialmembran (E,F) von unbehandelten MW-Patienten immunhistochemisch angefärbt. Repräsentative Aufnahmen der Doppelfärbung zeigen die Verteilung von DC-SIGN (A,E), S-100 (B,F), CD1a (C) und DC-LAMP (D) exprimierenden Zellen und *T. whipplei* in 200-facher (A-D) oder 100-facher (E,F) Vergrößerung sowie die intrazelluläre Lokalisation von *T. whipplei* in den 400-fach vergrößerten *Inserts*.

In den Hautbiopsien war *T. whipplei* vor allem in der Dermis nachweisbar (Abb. 3.14). Dort befanden sich viele DC-SIGN⁺ Zellen kolokalisiert mit *T. whipplei* (Abb. 3.14A). Die S-100⁺ und CD1a⁺ Langerhanszellen waren überwiegend in der Epidermis und nur vereinzelt in der Dermis präsent, wo sie ebenfalls intrazelluläre *T. whipplei*-Bakterien aufwiesen (Abb. 3.14B, C). Dagegen befanden sich DC-LAMP⁺ reife DC spärlich über die Dermis verteilt und kolokalisierten teilweise mit *T. whipplei* (Abb. 3.14D). In der Synovialmembran konnten nur DC-SIGN⁺ DC detektiert werden, von denen ein Teil mit einzelnen *T. whipplei* kolokalisierte, nicht aber S-100⁺, CD1a⁺ oder DC-LAMP⁺ DC.

Die Ergebnisse zeigten, dass unreife, insbesondere DC-SIGN⁺ DC in MW-Patienten sowohl am Ort der Primärinfektion, der Darmmukosa, als auch in peripheren Geweben wie Haut und Synovialmembran präsent sind und dort *T. whipplei*-Bakterien aufnehmen.

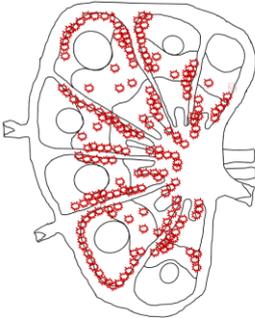
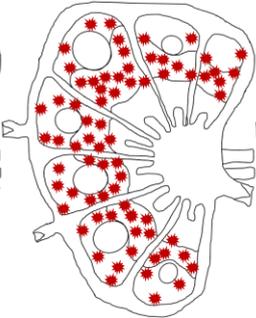
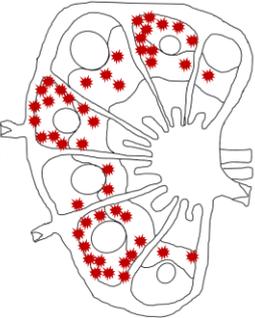
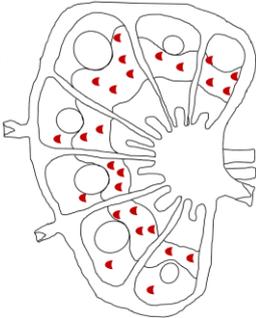
3.1.6 DC-Populationen und Aktivierung in Lymphknoten von MW-Patienten

Neben intestinalen Symptomen zeigen 55 % der Patienten mit einem klassischen MW auch eine Lymphknotenschwellung (Lymphadenopathie) [287].

Um zu untersuchen, inwiefern sich die Lymphknoten-Architektur durch die systemische Infektion mit *T. whipplei* verändert, wurden *T. whipplei* und verschiedene DC-Populationen in Lymphknoten von unbehandelten MW-Patienten immunhistochemisch angefärbt. Zum Vergleich wurde die Struktur der Lymphknoten von Kontrollpersonen mit entfernten Tumorerkrankungen („normal“), Sarkoidose oder aktiver Tuberkulose untersucht. Dabei wurden Paraffin-gängige Antikörper gegen DC-SIGN, S-100, CD1a und DC-LAMP zur Detektion verschiedener DC-Populationen verwendet.

In Tab. 3.1 ist das ermittelte Verteilungsmuster der verschiedenen DC-Populationen in normalen Lymphknoten schematisch dargestellt. Interdigitierende S-100⁺, CD1a⁺ oder DC-LAMP⁺ DC befanden sich vorrangig in cortikalen und paracortikalen T-Zell-Arealen. Dagegen traten DC-SIGN⁺ Zellen in dichten Netzwerken um Follikel und Markstränge sowie parakapsulär und nur vereinzelt in T-Zonen auf. In Vorversuchen zeigte die Gegenfärbung von Markern für verschiedene DC- und Makrophagen-Populationen, dass DC-SIGN⁺ Zellen im Lymphknoten eine heterogene Population bilden, bestehend aus CD163⁺ alternativ aktivierten M2-Makrophagen und S-100⁺ interdigitierenden DC.

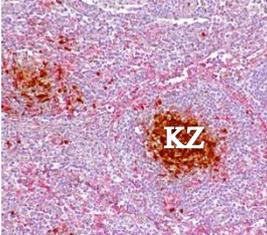
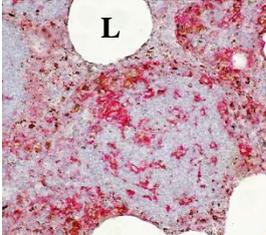
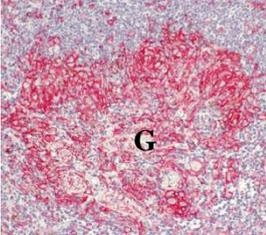
Tab. 3.1: Verteilungsmuster verschiedener DC-Populationen in normalen Lymphknoten

DC-Marker:	DC-SIGN	S-100	CD1a	DC-LAMP
				
Expression:	Zelloberfläche	Oberfläche/intrazellulär	Oberfläche/intrazellulär	intrazellulär
Muster:	dichte Netzwerke (breite Bänder)	Ansammlung vieler einzelner Zellen	Gruppen einzelner Zellen	vereinzelte Zellen
Lokalisation:	um Markstränge, subkapsulär, einzelne Zellen (para)cortikal (T-Zone)	(para)cortikal (T-Zone)	subkapsulär, (para)cortikal (T-Zone)	(para)cortikal (T-Zone)

Die Verteilung der DC-Populationen wurde in 10 unauffälligen Lymphknoten von Personen mit entfernten Tumorerkrankungen nach der immunhistochemischen Färbung mikroskopisch untersucht und schematisch zusammengefasst.

In 14 von 16 Lymphknoten aus MW-Patienten war *T. whipplei* eindeutig nachweisbar (Tab. 3.2). Anhand ihrer charakteristischen Architektur konnten diese Lymphknoten in Zusammenarbeit mit dem Pathologen Prof. Dr. Christoph Loddenkemper in drei Stadien eingeteilt werden (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Einteilung der Lymphknoten von MW-Patienten in drei Stadien

Stadium	I	II	III
APZ (CD11c⁺) & <i>T. whipplei</i>			
Architektur	a) unauffällig b) vergrößerte Keimzentren, kleinherdige Granulome	Lymphangiectasien, keine Keimzentren	Sarkoidose-artig: Granulome, mehrkernige Riesenzellen, keine Keimzentren
Anzahl	6	3	5

APZ, Antigen präsentierende Zellen; KZ, Keimzentrum; L, Lymphangiectasie; G, Granulom; a) frühes erstes Stadium, b) spätes erstes Stadium.

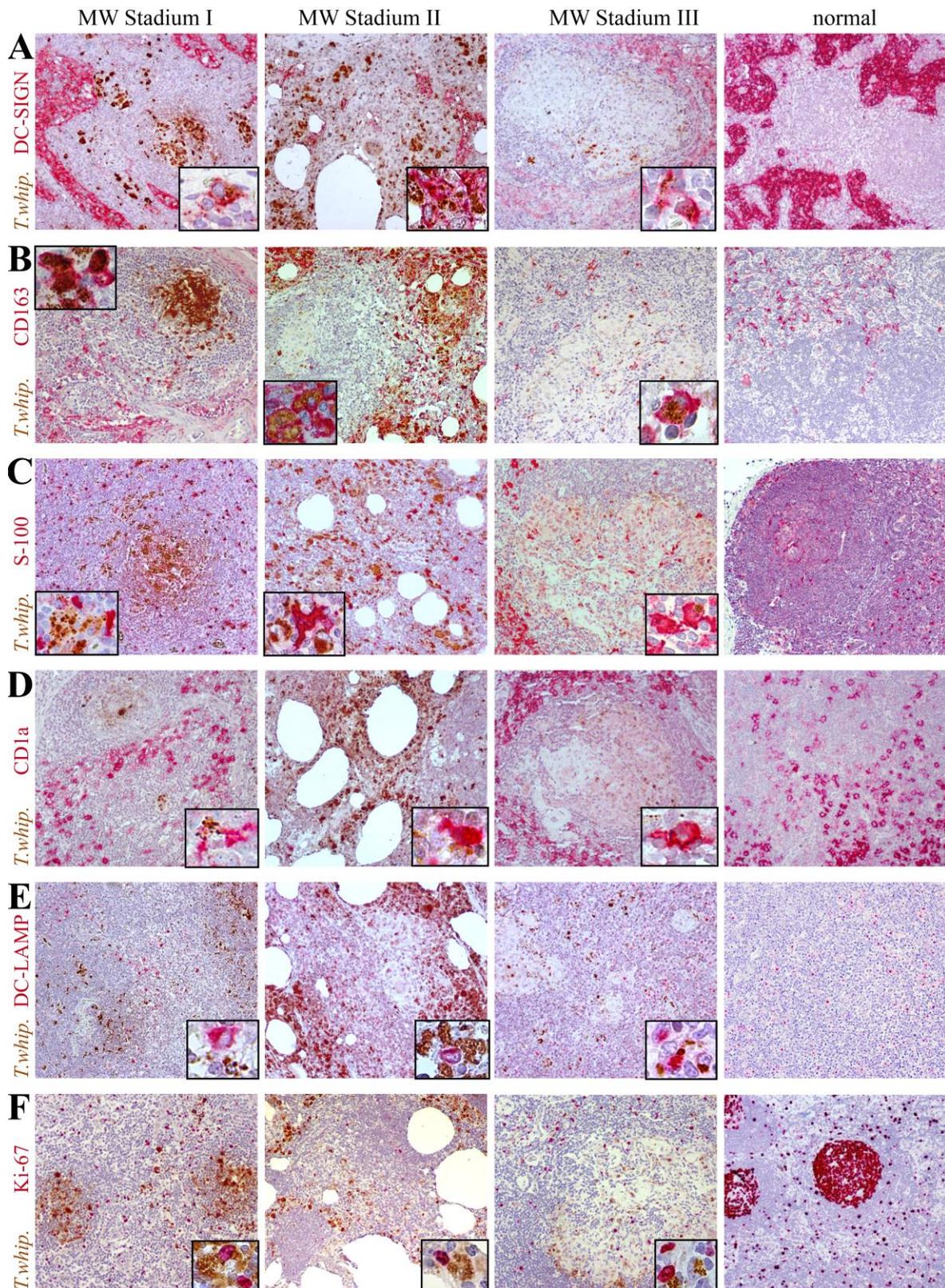


Abb. 3.15: DC-Populationen und Lymphozytenaktivierung in Lymphknoten von MW-Patienten

Verschiedene DC-Populationen (A und C-E), Makrophagen (B) oder proliferierende Zellen (F) und *T. whipplei* wurden in Lymphknotenpräparaten immunhistochemisch angefärbt. Repräsentative Fotos der Doppelfärbung zeigen die Verteilung von DC-SIGN (A), CD163 (B), S-100 (C), CD1a (D), DC-LAMP (E) und Ki-67 (F) exprimierenden Zellen (rot) und *T. whipplei* (braun) in Lymphknoten von unbehandelten MW-Patienten in verschiedenen Stadien und Personen mit entfernten Tumorkläsionen ("normal") in 100-facher bzw. 400-facher (Insert) Vergrößerung.

Im ersten Stadium erschien die Lymphknoten-Architektur weitgehend intakt. Die Keimzentren waren deutlich erkennbar, aber teilweise hatten sich schon kleine Granulome aus epitheloidzellartigen Gewebemakrophagen (Histiozyten) und mehrkernige Riesenzellen gebildet. Im frühen ersten Stadium fanden sich zunächst vereinzelt *T. whipplei* über Lymphfollikel und paracortikale Bereiche verteilt (nicht gezeigte Daten). Das späte erste Stadium war hingegen durch eine Ansammlung von *T. whipplei* in den Keimzentren gekennzeichnet (Tab. 3.2, Abb. 3.15). Sowohl die Netzwerke aus DC-SIGN⁺ unreifen DC am Rand des Paracortex und der Markstränge, als auch interdigitierende S-100⁺, CD1a⁺ und DC-LAMP⁺ DC in corticalen und paracorticalen T-Zell-Arealen waren in Lymphknoten von MW-Patienten im ersten Stadium, ebenso wie in normalen Lymphknoten, vorhanden (Abb. 3.15A, C-E). Aber bereits im späten ersten Stadium war die Proliferation der B-Lymphozyten in den Keimzentren mit eingewanderten *T. whipplei* im Vergleich zu normalen Keimzentren verringert (Abb. 3.15F).

Die Lymphknoten des zweiten Stadiums zeigten eine weitgehende Zerstörung durch Erweiterungen der Lymphgefäße (Lymphangiectasien) infolge der massiven Infiltration mit vergrößerten, prall mit *T. whipplei* gefüllten Makrophagen, welche den gesamten Lymphknoten einnahmen [339]. Eine Zonierung des Lymphknotens und erkennbare Keimzentren gab es im zweiten Stadium nicht mehr. Die DC-SIGN⁺ unreifen DC bildeten nur noch kleine Inseln (Abb. 3.15A). Während sich S-100⁺ interdigitierende DC regelmäßig über den Lymphknoten verteilten, waren DC-LAMP⁺ oder CD1a⁺ reife DC nahezu verschwunden (Abb. 3.15C-E). Proliferierende Zellen traten im zweiten Stadium nur noch vereinzelt auf (Abb. 3.15F).

Das dritte Lymphknotenstadium der MW-Patienten ähnelte dem Erscheinungsbild einer Sarkoidose. Zwar waren Kapsel, Randsinus und einzelne Follikel im Cortex sichtbar, aber weite Bereiche des Lymphknotens zeigten eine Zerstörung durch unterschiedlich ausgedehnte Granulome mit einzelnen mehrkernigen Riesenzellen. Die Granulome bestanden hauptsächlich aus CD11c^{high} Zellen (Tab. 3.2), den sog. Histiozyten, und konnten nicht mit Antikörpern gegen DC-SIGN oder CD163 angefärbt werden (Abb. 3.15A, B). In Lymphknoten des dritten Stadiums waren nur vereinzelt *T. whipplei*-Bakterien nachweisbar. Außerhalb der Granulome befand sich ein, im Vergleich zu normalen Lymphknoten reduziertes Netzwerk aus DC-SIGN⁺ unreifen DC (Abb. 3.15A). Die S-100⁺, CD1a⁺ und DC-LAMP⁺ DC waren in ihrer Anzahl verringert und wurden meist außerhalb, aber vereinzelt auch innerhalb der Granulome nachgewiesen (Abb. 3.15C-E). Proliferierende Zellen befanden sich sowohl außerhalb als auch in den Granulomen. Jedoch fehlten Keimzentren mit proliferierenden B-Lymphozyten (Abb. 3.15F).

Während in allen drei Lymphknoten-Stadien die infiltrierenden CD163⁺ Makrophagen mit *T. whipplei* vollgefüllt waren (Abb. 3.15B), trugen die meisten DC-SIGN⁺ unreifen DC nur einzelne *T. whipplei*-Bakterien (Abb. 3.15A). Nur in einem geringen Teil der S-100⁺, CD1a⁺ oder DC-LAMP⁺ reifen DC war *T. whipplei* nachweisbar (Abb. 3.15C-E).

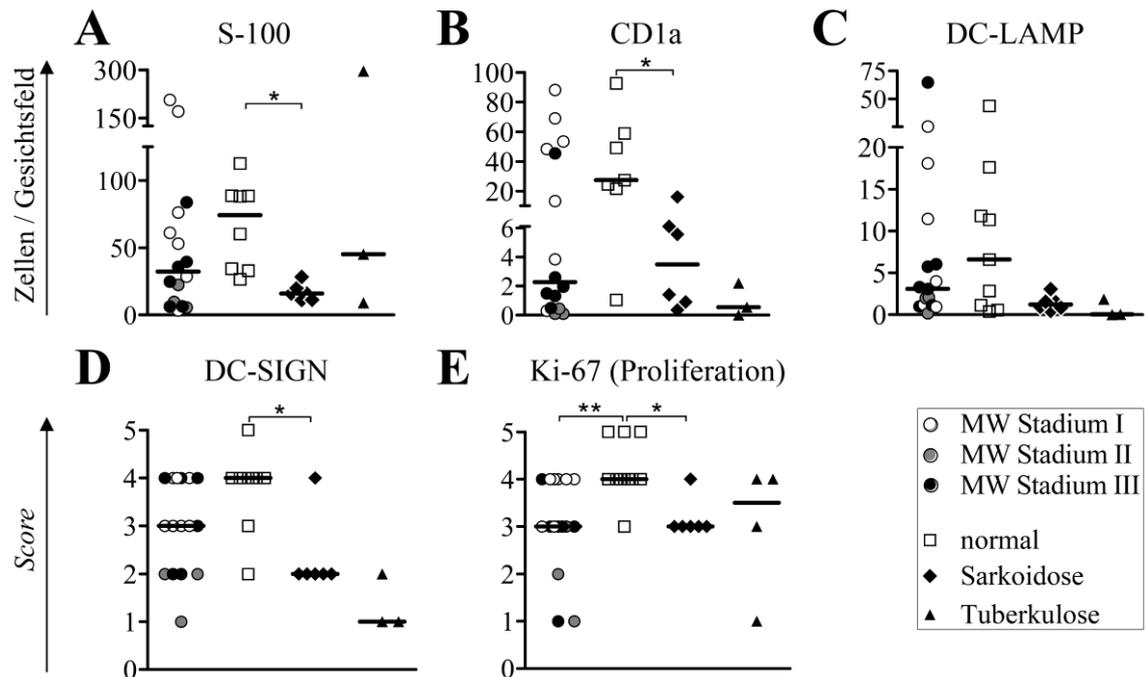


Abb. 3.16: Quantifizierung von DC-Populationen und Proliferation in Lymphknoten von MW-Patienten

In Lymphknoten von unbehandelten MW-Patienten (Stadium 1: *weiß*, 2: *grau*; 3: *schwarz*) und Personen mit entfernten Tumorerkrankungen („normal“), Sarkoidose oder einer Tuberkulose wurde die Anzahl der S-100⁺ (A), CD1a⁺ (B) und DC-LAMP⁺ (C) Zellen pro Gesichtsfeld bestimmt bzw. der *Score* für die Frequenz von DC-SIGN⁺ Zellen (D) oder für die Proliferation (Ki-67⁺) (E) ermittelt (DC-SIGN-Score: 5: breite DC-SIGN⁺-Netzwerke parafollikulär und im Außenbereich des Paracortex; 4: schmale DC-SIGN⁺-Netzwerke im Außenbereich des Paracortex; 3: DC-SIGN⁺-Inseln; 2: isolierte kleinere Ansammlungen von DC-SIGN⁺; 1: kaum bis keine DC-SIGN⁺; Ki-67-Score: 5: vergrößerte Keimzentren mit massiver Proliferation und Ki-67⁺ Zellen in T-Zonen des Paracortex; 4: normal große Ki-67⁺ Keimzentren sowie Ki-67⁺ Zellen in T-Zonen; 3: keine Ki-67⁺ Keimzentren, aber viele Ki-67⁺ in T-Zonen; 2: wenige Ki-67⁺ in T-Zonen; 1: kaum bis keine Ki-67⁺). Dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte. Der Median-Wert ist jeweils als Linie eingezeichnet. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Dunnett-Test (* p-Wert < 0,05; ** p-Wert < 0,01).

Die quantitative Beurteilung der Lymphknoten ergab eine tendenzielle Verringerung des DC-SIGN⁺-Netzwerks und der Anzahl an S-100⁺, CD1a⁺ oder DC-LAMP⁺ interdigitierenden DC bei MW-Patienten (insbesondere in den Stadien zwei und drei) im Vergleich zu normalem Lymphknotengewebe (Abb. 3.16A-D). Lymphknoten von Sarkoidose- und Tuberkulose-Patienten zeigten eine noch stärkere Reduktion des DC-SIGN⁺-Netzwerks und der Anzahl S-100⁺, CD1a⁺ oder DC-LAMP⁺ interdigitierender DC im Vergleich zu normalem Lymphknotengewebe (Abb. 3.16A-D). Die Proliferation in den Keimzentren und T-Zonen der Lymphknoten von MW-Patienten war, ebenso wie bei Sarkoidose, im Vergleich zu normalem Lymphknotengewebe signifikant verringert (Abb. 3.16E).

Die wesentlichen immunologischen Veränderungen in *T. whipplei*-positiven Lymphknoten von MW-Patienten sind in Tab. 3.3 zusammengefasst.

Tab. 3.3: Veränderungen der DC-Population und Proliferation in Lymphknoten von MW-Patienten

Stadium	<i>T. whipplei</i>	DC-Populationen	Aktivierung
I	a) vereinzelt in Follikeln und Paracortex b) in Keimzentren akkumuliert	dichtes DC-SIGN ⁺ -Netzwerk; reife DC in T-Zone	Proliferation in Keimzentren und T-Zone
II	Akkumulation in M ϕ , die gesamten Lymphknoten infiltrieren und Lymphgefäße blockieren	isolierte inselförmige Ansammlungen DC-SIGN ⁺ Zellen; nahezu keine reifen DC	stark verringerte Proliferation
III	vereinzelt im Randbereich der Granulome	reduziertes DC-SIGN ⁺ -Netzwerk, wenige reife DC, teilweise in Granulomen	verringerte Proliferation

a) frühes Stadium, b) spätes erstes Stadium; M ϕ , Makrophagen

Lymphknoten von MW-Patienten zeigten infolge der Infektion mit *T. whipplei* erhebliche morphologische Veränderungen wie den Verlust von Keimzentren und die Bildung von Lymphangiektasien und Granulomen. Diese wurden von immunologischen Veränderungen begleitet, zu denen die Infiltration von *T. whipplei*-gefüllten Makrophagen, die Verringerung der DC-Dichte und die Abnahme der Proliferation in B-Zell-Follikeln und T-Zell-Arealen gehören.

3.2 T-Zellaktivität in Morbus Whipple-Patienten

3.2.1 Charakterisierung der T-Zellpopulationen im Blut von MW-Patienten

Es wurde beschrieben, dass MW-Patienten im Blut einen Mangel an CD3⁺ T-Lymphozyten und eine Verschiebung der CD4/CD8-Ratio zugunsten der CD8⁺ T-Zellen aufweisen [387, 346].

Um zu untersuchen, ob die Reduktion der T-Zellen in MW-Patienten ausschließlich die CD4⁺ Population betrifft, wurden der Anteil und die Konzentration der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Blut von MW-Patienten vor und nach Antibiotika-Therapie durchflusszytometrisch bestimmt (Kap. 2.5.5). Zum Vergleich wurden die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen im Blut von gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit einer akuten intestinalen Infektion durch Noroviren, enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) oder *Campylobacter* analysiert (Abb. 3.17).

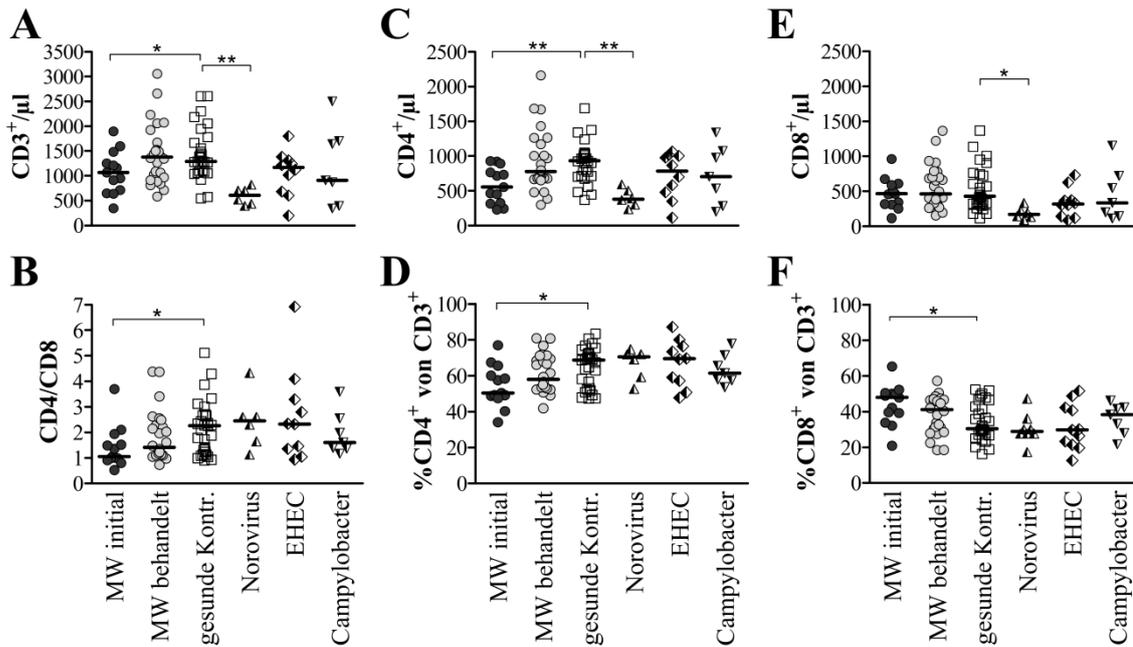


Abb. 3.17: Anzahl und Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Blut von MW-Patienten und Kontrollgruppen

Die T-Zellpopulation wurde im Blut von MW-Patienten, gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit einer akuten Infektion durch Norovirus, EHEC oder *Campylobacter* durchflusszytometrisch untersucht. A,C,E: Die Zellzahl pro μl Blut wurde mit Hilfe von *Trucount*TM-Röhrchen für T-Zellen (CD3⁺) insgesamt (A), sowie CD4⁺ (C) und CD8⁺ (E) T-Zellen bestimmt. B,D und F zeigen den jeweiligen Anteil CD4⁺ (D) und CD8⁺ (F) Zellen an der T-Zellpopulation und die Ratio (B) dieser beiden Populationen. Dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte und der Median-Wert für jede Untersuchungsgruppe. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Dunnett-Test (* p-Wert < 0,05; ** p-Wert < 0,01).

Die Anzahl der CD3⁺ T-Lymphozyten im Blut war bei unbehandelten MW-Patienten, aber auch bei Patienten mit einer akuten Norovirus-Infektion im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant reduziert (Abb. 3.17A). Eine Verschiebung der CD4/CD8 Ratio im Blut zugunsten der CD8⁺ T-Zellen war nur bei MW-Patienten vor Therapiebeginn, nicht aber bei behandelten MW-Patienten und den untersuchten Kontrollpersonen mit einer akuten intestinalen Infektion zu beobachten (Abb. 3.17B). Entsprechend zeigten MW-Patienten im Blut initial einen verringerten Anteil der CD4⁺ und einen erhöhten Anteil der CD8⁺ Zellen an der T-Lymphozytenpopulation (Abb. 3.17D, F). Auch die Konzentration der CD4⁺ T-Zellen war im Blut von MW-Patienten initial verringert, näherte sich aber nach der Behandlung dem Wert der gesunden Kontrollpersonen an (Abb. 3.17C). Dagegen lag die Konzentration der CD8⁺ T-Zellen im Blut von MW-Patienten, unabhängig vom Therapiestatus, auf dem Niveau gesunder Kontrollpersonen (Abb. 3.17E). Während Patienten mit einer Norovirus-Infektion eine reduzierte Konzentration beider T-Zellpopulationen (CD4⁺ und CD8⁺) im Blut zeigten (Abb. 3.17C, E), wiesen Patienten mit einem Befall durch EHEC oder *Campylobacter* im Vergleich zu Gesunden keine signifikanten Veränderungen in der Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Blut auf (Abb. 3.17C, E).

Die erniedrigte CD4/CD8 Ratio im Blut von unbehandelten MW-Patienten war also nicht auf eine Erhöhung der CD8⁺ T-Zellpopulation zurückzuführen, sondern kam durch die selektive Reduktion der CD4⁺ T-Zellpopulation zustande.

Mögliche Ursachen für die verringerte CD4⁺ T-Zellzahl im Blut der MW-Patienten wären ein durch die chronische Immunaktivierung verstärkter Verbrauch von CD4⁺ Effektor-T-Zellen bei gleichzeitig mangelndem Nachschub naiver CD4⁺ T-Zellen aus dem Thymus.

Um die CD4⁺ T-Zellpopulation im Blut der MW-Patienten hinsichtlich ihres Effektor-Status zu charakterisieren, wurden CD4⁺ T-Lymphozyten anhand der Expression von CD45RA und CCR7 in naive T-Zellen, zentrale T-Gedächtniszellen (T_{CM}), T-Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) und terminal differenzierte T-Effektor-Gedächtniszellen (T_{EMRA}) eingeteilt (Abb. 3.18A und Tab. 3.4) [175, 193]. Innerhalb der naiven CD4⁺ Population wurden CD31⁺ Zellen, in denen kürzlich aus dem Thymus emigrierte, also Thymus-naive RTE angereichert sind [199], von den CD31⁻ zentral-naiven CD4⁺ abgegrenzt (Abb. 3.18A und Tab. 3.4). Die RTE füllen den T-Zellpool auf, was besonders unter Lymphopenie-Bedingungen, wie bei MW-Patienten, von großer Bedeutung ist. Unter Zuhilfenahme der bestimmten T-Zellzahl (Abb. 3.17) wurden die Konzentrationen der einzelnen CD4⁺ T-Zellsubpopulation im Blut berechnet.

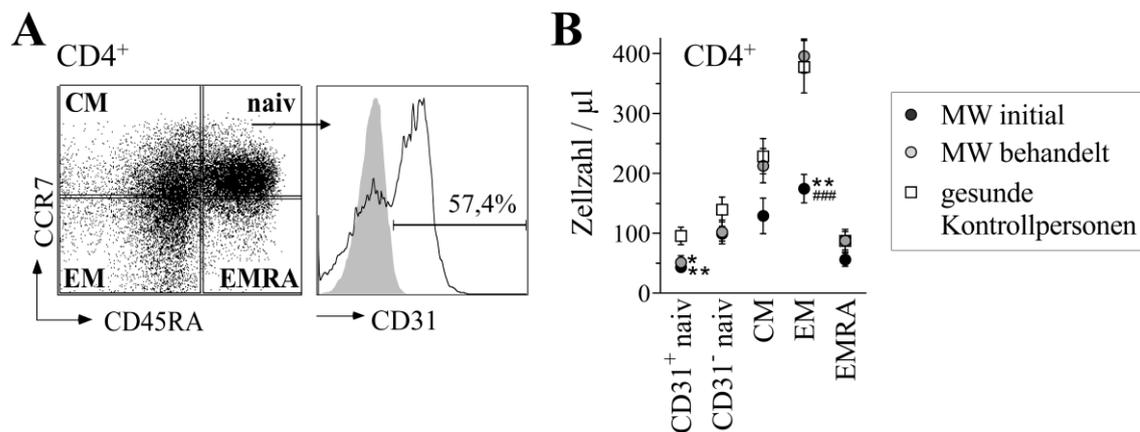


Abb. 3.18: Konzentration der T-Zellsubpopulationen im Blut von MW-Patienten und Kontrollpersonen

Die CD4⁺ T-Zellsubpopulationen wurden im Blut von MW-Patienten vor und nach Therapie sowie im Blut von gesunden Kontrollpersonen durchflusszytometrisch untersucht. A: Dargestellt ist die Analysestrategie zur Einteilung der CD4⁺ T-Zellsubpopulationen (CM, zentrale Gedächtniszellen; EM, Effektor-/Gedächtniszellen; EMRA, terminal differenzierte Effektor-/Gedächtniszellen) und zur Identifizierung der CD31⁺ Thymus-naiven CD4⁺ T-Zellen. B zeigt die anhand der T-Lymphozytenzahl pro µl Blut berechneten absoluten Zellzahlen für die einzelnen CD4⁺ Subpopulationen. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (*p < 0,05 und **p < 0,01 für Unterschiede zu gesunden Kontrollpersonen; ###p < 0,001 für Unterschiede zu MW nach Behandlung).

Tab. 3.4: Prozentuale Verteilung der CD4⁺ T-Zellsubpopulationen im Blut

CD4 ⁺ T-Zell- subpopulationen	% von CD4 ⁺		
	MW initial	MW behandelt	gesunde Kontrollpersonen
naiv	27,9 (±3,1)	*17,0 (±2,4)	26,5 (±2,5)
CD31⁺ Thymus-naiv	8,5 (±1,8)	**5,6 (±1,1)	10,2 (±1,2)
CD31⁻ zentral-naiv	19,4 (±3,8)	11,4 (±1,9)	16,2 (±1,8)
Effektor-/ Gedächtnis	72,1 (±3,1)	*83,0 (±2,4)	73,6 (±2,5)
CM	27,3 (±4,9)	24,8 (±2,5)	26,4 (±1,9)
EM	35,1 (±3,8)	*#48,4 (±2,9)	38,9 (±2,4)
EMRA	9,7 (±1,7)	9,7 (±1,6)	8,3 (±1,0)

Angegeben sind die Mittelwerte (±SEM) des prozentualen Anteils an der CD4⁺ T-Zellpopulation. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (* p < 0,05 und ** p < 0,01 Unterschiede zu gesunden Kontrollpersonen; # p < 0,05 Unterschied zu MW vor Behandlung). *CM*, zentrale Gedächtniszellen; *EM*, Effektor-Gedächtniszellen; *EMRA*, terminal differenzierte Effektor-Gedächtniszellen.

Während sich die prozentuale Zusammensetzung des CD4⁺ T-Zellpools im Blut der MW-Patienten initial nicht wesentlich von der in gesunden Kontrollpersonen unterschied, fiel bei behandelten MW-Patienten eine signifikante Verschiebung in der CD4⁺ T-Zellpopulation auf (Tab. 3.4). Nach der Behandlung zeigten MW-Patienten einen reduzierten Anteil naiver, insbesondere CD31⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen und unbehandelten MW-Patienten. Hingegen war der Anteil der Effektor-/Gedächtniszellen, insbesondere der T_{EM}, an der CD4⁺ T-Zellpopulation bei behandelten MW-Patienten erhöht (Tab. 3.4).

Bei Betrachtung der Zellzahlen pro µl Blut fiel auf, dass MW-Patienten unabhängig vom Therapiestatus eine verringerte Konzentration an CD31⁺ naiven CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen mit gleicher Altersverteilung aufwiesen (Abb. 3.18B). Die Konzentration der Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen im Blut, insbesondere der T_{EM}, war bei MW-Patienten vor Therapiebeginn deutlich verringert, stieg jedoch nach der Behandlung auf den Normalwert der gesunden Kontrollpersonen an (Abb. 3.18B).

Beide Faktoren, zum einen die Verringerung der Effektor-T-Zellpopulation und zum anderen der verminderte Nachschub naiver T-Zellen aus dem Thymus, scheinen also zur Reduktion der CD4⁺ T-Zellzahlen im Blut von unbehandelten MW-Patienten beizutragen. Nach der Behandlung steigt lediglich die CD4⁺ Effektor-T-Zellpopulation wieder an, während die Anzahl CD31⁺ naiver CD4⁺ T-Zellen (die RTE enthalten) im Blut der MW-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen weiterhin verringert bleibt.

3.2.2 Einwanderung der T-Zellen in den Darm bei Patienten mit MW

Zirkulierende T-Zellen benötigen *Homing*-Moleküle wie Integrin $\alpha_4\beta_7$, um in den Darm, den Ort der primären *T. whipplei*-Infektion, einwandern zu können [177, 176]. Während die Integrin α_4 -Untereinheit (CD49d) von nahezu allen T-Zellen im Blut exprimiert wird, ist die Expression von β_7 mit dem Ausmaß der Einwanderung in den Darm assoziiert [388, 389].

Um zu untersuchen, ob die T-Zellen in MW-Patienten das Potenzial zur Einwanderung in den Darm besitzen, wurde die Expression der Integrin-Untereinheit β_7 auf CD4⁺ T-Zellen im Blut von MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 3.19A). Zur Bestätigung des Migrationspotenzials der zirkulierenden CD4⁺ T-Zellen wurden CD4⁺ und CD45RO⁺ Effektor-/Gedächtnis-Zellen in Duodenalbiopsien von MW-Patienten und Kontrollpersonen mit unauffälligem Befund immunhistochemisch angefärbt und ausgezählt (Abb. 3.19B, C).

Der Anteil der CD4⁺ T-Zellen im Blut, die das Darm-*Homing* Molekül Integrin β_7 exprimieren, war bei MW-Patienten unabhängig vom Therapiestatus im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen verringert (Abb. 3.19A). In Übereinstimmung mit dem reduzierten Darm-Migrationspotenzial der zirkulierenden CD4⁺ T-Zellen zeigten MW-Patienten auch eine signifikant verringerte Anzahl an CD4⁺ und CD45RO⁺ Effektor-/Gedächtnis-Zellen im Duodenum, die selbst nach der Therapie nicht auf das Niveau der Kontrollpersonen anstieg (Abb. 3.19B, C). Folglich reflektiert der niedrige Anteil zirkulierender CD4⁺ T-Zellen mit Darm-*Homing* in MW-Patienten die reduzierte Einwanderung von CD4⁺ T-Zellen in den Darm.

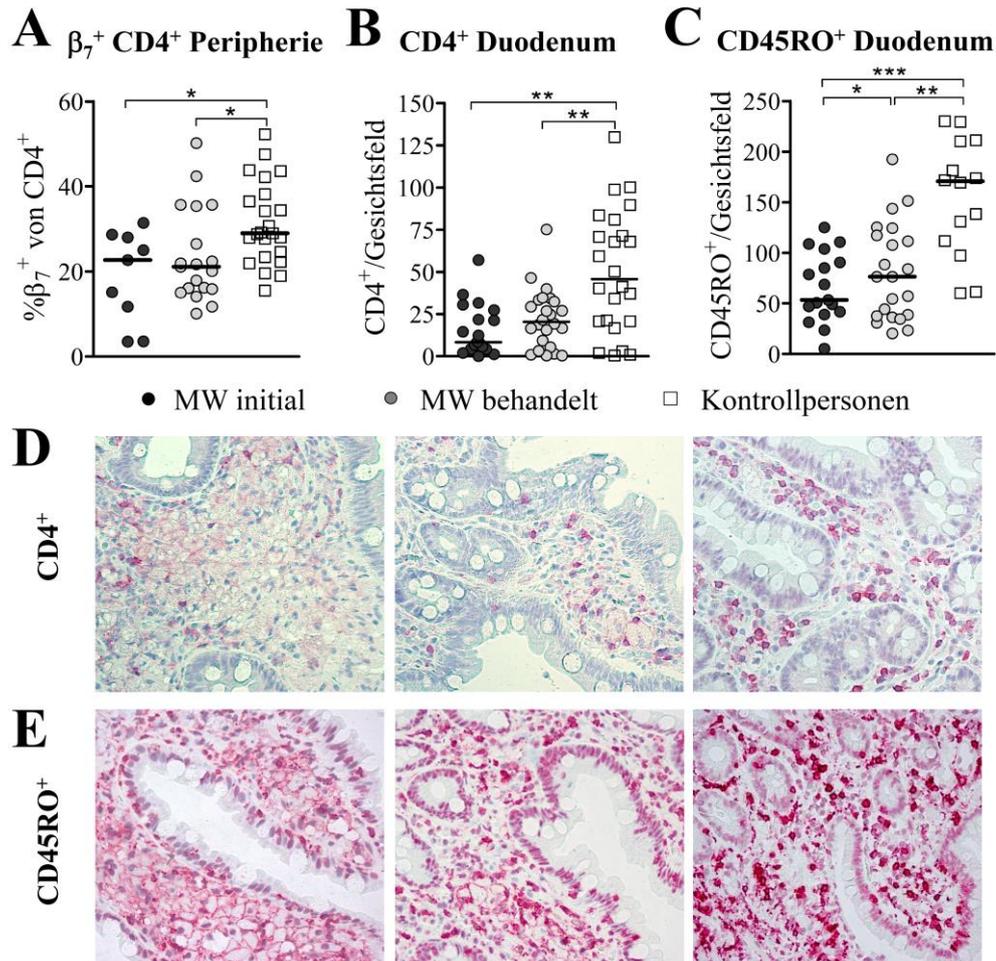


Abb. 3.19: Einwanderung von CD4⁺ und Effektorzellen in den Darm bei MW-Patienten und Kontrollpersonen

A: Der Anteil der CD4⁺ T-Zellen mit Tropismus für den Darm wurde im Blut von MW-Patienten vor und nach Therapie und gesunden Kontrollpersonen durchflusszytometrisch untersucht. B-E: CD4⁺ (B,D) und CD45RO⁺ (C,E) Zellen wurden in Duodenalbiopsien von MW-Patienten initial und nach Behandlung sowie von Kontrollpersonen mit unauffälligem Befund immunhistochemisch detektiert. D,E: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen zeigen die CD4⁺ (D) und CD45RO⁺ (E) Zellen (rot) im Duodenum. B,C: Die Anzahl der CD4⁺ (B) und CD45RO⁺ (C) Zellen pro Gesichtsfeld wurde bestimmt. A-C: Dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte. Der Median-Wert ist jeweils als Linie eingezeichnet. Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests (* p-Wert < 0,05; ** p-Wert < 0,01; *** p-Wert < 0,001).

3.2.3 Regulatorische T-Zell-Aktivität in MW-Patienten

T_{reg} im Lymphknoten von MW-Patienten

Um zu untersuchen, ob das für MW-Patienten beschriebene anti-inflammatorische Milieu [338, 352] zu einer verstärkten Generierung von T_{reg} führt, wurde die Anzahl der FOXP3⁺ Zellen in Lymphknotenpräparaten von unbehandelten MW-Patienten und Kontrollpersonen mit entfernten Tumorerläsionen, Sarkoidose oder einer Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberkulose) immunhistochemisch bestimmt (Abb. 3.20).

Die FOXP3⁺ Zellen waren sowohl bei MW-Patienten als auch bei den Kontrollgruppen gleichmäßig über den Lymphknoten verteilt. Die Doppelfärbung von FOXP3 und *T. whipplei* in Lymphknoten von MW-Patienten zeigte, dass sich FOXP3⁺ Zellen auch in unmittelbarer Nähe zu Zellen befanden, die mit *T. whipplei*-Bakterien angefüllt waren (Abb. 3.20A). Mesenteriale Lymphknoten (mLK) von MW-Patienten zeigten eine etwas geringere Anzahl FOXP3⁺ Zellen im Vergleich zu den Lymphknoten der Peripherie (pLK) (Median mLK: 53,9 vs. pLK: 80,1 Zellen pro Gesichtsfeld; Abb. 3.20B). Die Anzahl der FOXP3⁺ Zellen im Lymphknoten unterschied sich jedoch nicht signifikant zwischen MW-Patienten und den drei Kontrollgruppen (normal, Tuberkulose, Sarkoidose) (Abb. 3.20B).

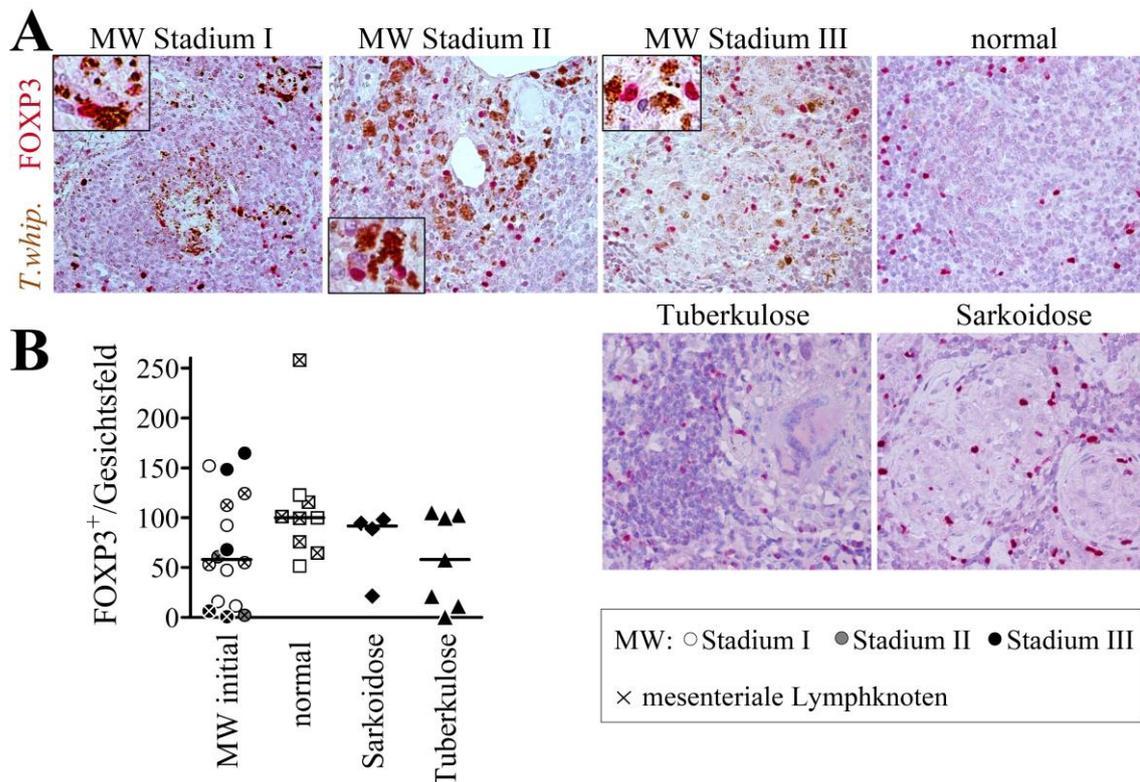


Abb. 3.20: T_{reg} in Lymphknoten von MW-Patienten und Kontrollpersonen

FOXP3⁺ Zellen wurden in Lymphknotenpräparaten immunhistochemisch angefärbt. A: Die repräsentativen Fotos der Doppelfärbung von FOXP3 (rot) und *T. whipplei* (*T.whip*; braun) in Lymphknoten von MW-Patienten vor Beginn der Antibiose (initial) sowie in Kontroll-Lymphknoten (normal, Tuberkulose, Sarkoidose) wurden mit 200-facher bzw. 400-facher (*Insert*) Vergrößerung aufgenommen. B: Die Anzahl der FOXP3⁺ Zellen pro Gesichtsfeld wurde in Lymphknoten (*gekreuzte Symbole*: mesenteriale Lokalisation) von unbehandelten MW-Patienten (Stadium I weiß, II grau; III schwarz) und Kontrollpersonen mit entfernten Tumorerläsionen (normal), Sarkoidose oder Tuberkulose bestimmt. Dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte. Der Median-Wert ist jeweils als Linie eingezeichnet. Die statistische Analyse mittels einfaktorier ANOVA und anschließendem Dunnett-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

T_{reg} in der duodenalen Mukosa von MW-Patienten

Um festzustellen, ob T_{reg} am Ort der primären *T. whipplei*-Infektion vorhanden sind, wurden FOXP3⁺ Zellen in Duodenalbiopsien von MW-Patienten vor und nach Antibiotika-Behandlung und von Kontrollpersonen ohne chronische *T. whipplei*-Infektion immunhistochemisch angefärbt.

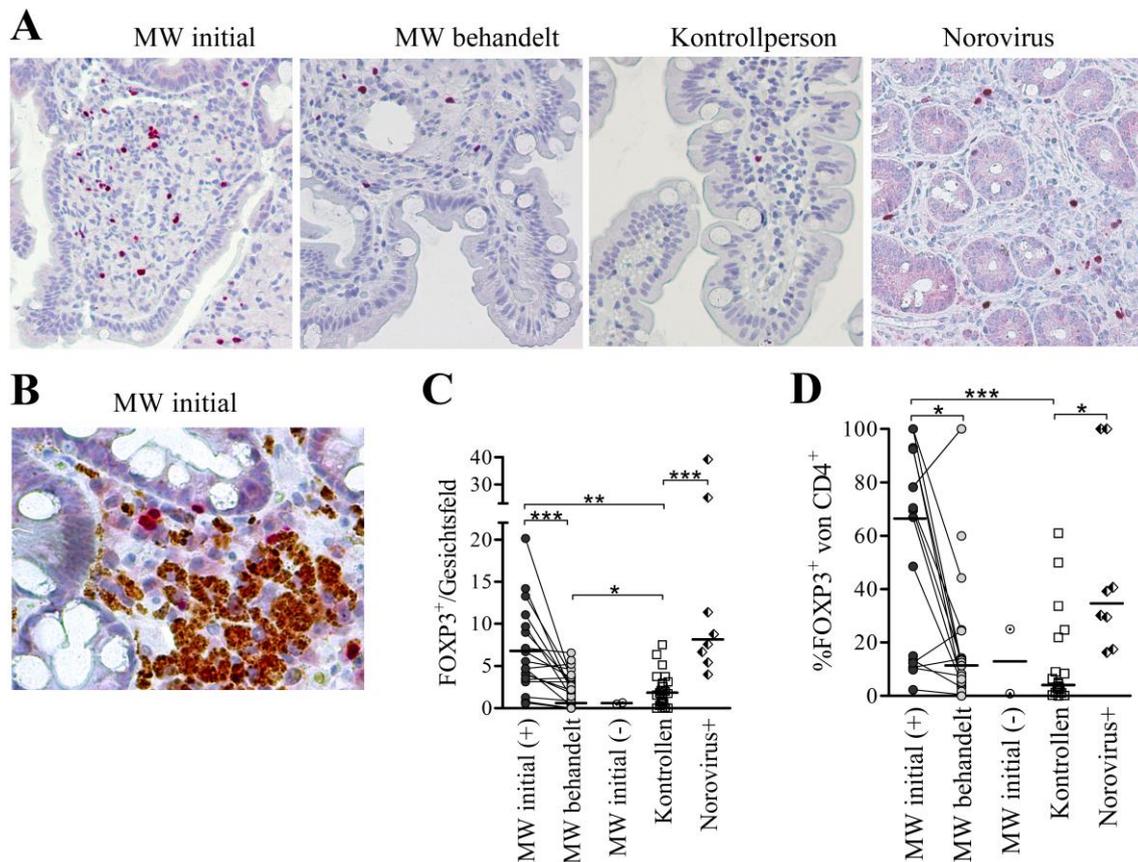


Abb. 3.21: T_{reg} in der duodenalen Mukosa von MW-Patienten und Kontrollpersonen

FOXP3⁺ Zellen wurden in Duodenalbiopsien von MW-Patienten initial (mit (+) und ohne (-) *T. whipplei*-Nachweis im Darm) und nach Therapie, Kontrollpersonen mit unauffälligem Befund und Patienten mit einer Norovirus-Infektion immunhistochemisch angefärbt. *A,B*: Repräsentative Aufnahmen zeigen FOXP3⁺ Zellen (rot) in der Lamina propria bei 200-facher Vergrößerung (*A*) oder die Doppelfärbung von FOXP3 (rot) und *T. whipplei* (braun) im Duodenum eines unbehandelten MW-Patienten bei 400-facher Vergrößerung (*B*). *C,D*: Dargestellt ist zum einen die mittlere Anzahl der FOXP3⁺ Zellen pro Gesichtsfeld (*C*) und zum anderen die Anzahl der FOXP3⁺ pro 100 CD4⁺ Zellen. Der jeweilige Median-Wert ist eingezeichnet und die Verbindungslinien zwischen den Datenpunkten vor und nach Behandlung zeigen den Verlauf der FOXP3⁺ Zahlen für die einzelnen MW-Patienten. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorier ANOVA und anschließendem Dunnett-Test für unabhängige Untersuchungsgruppen oder des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für gepaarte Daten von MW-Patienten initial und behandelt (* p-Wert < 0,05; ** p-Wert < 0,01; *** p-Wert < 0,001).

MW-Patienten zeigten initial eine erhöhte Anzahl an FOXP3⁺ Zellen in der Lamina propria im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 3.21A, C). Die FOXP3⁺ Zellen befanden sich in der duodenalen Mukosa von MW-Patienten eng benachbart zu Makrophagen, die mit *T. whipplei* angefüllt waren (Abb. 3.21B). Nach der Eliminierung der Bakterien durch die Antibiotika-Behandlung sank die Anzahl der FOXP3⁺ Zellen im Duodenum der MW-Patienten unter den Wert der Kontrollgruppe ab (Abb. 3.21C). Interessanterweise war bei den beiden untersuchten MW-Patienten, die aufgrund

ihres isolierten neurologischen bzw. Gelenk-Befalls keine *T. whipplei* im Darm trugen, initial nur eine geringe Anzahl an FOXP3⁺ Zellen im Duodenum nachweisbar (Abb. 3.21C). Eine erhöhte Anzahl von FOXP3⁺ Zellen im Duodenum war auch bei Patienten mit einer akuten Infektion durch Noroviren zu finden (Abb. 3.21C). Während es sich jedoch im Duodenum von unbehandelten MW-Patienten (mit *T. whipplei*-Nachweis) bei nahezu drei Viertel der CD4⁺ Zellen um T_{reg} handelte, betrug der Anteil FOXP3⁺ Zellen an CD4⁺ Zellen bei Norovirus-Patienten lediglich ein Drittel (Abb. 3.21D).

Regulatorische T-Zellpopulationen im Blut von MW-Patienten

Chronische systemische Infektionen sind oftmals mit Veränderungen der Anzahl und Aktivität von T_{reg} im Blut assoziiert [390, 391, 392]. Um festzustellen, ob in MW-Patienten der Anteil oder die Aktivierung der zirkulierenden T_{reg} im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen erhöht ist, wurde der Phänotyp der CD4⁺ T-Zellen im Blut durchflusszytometrisch analysiert.

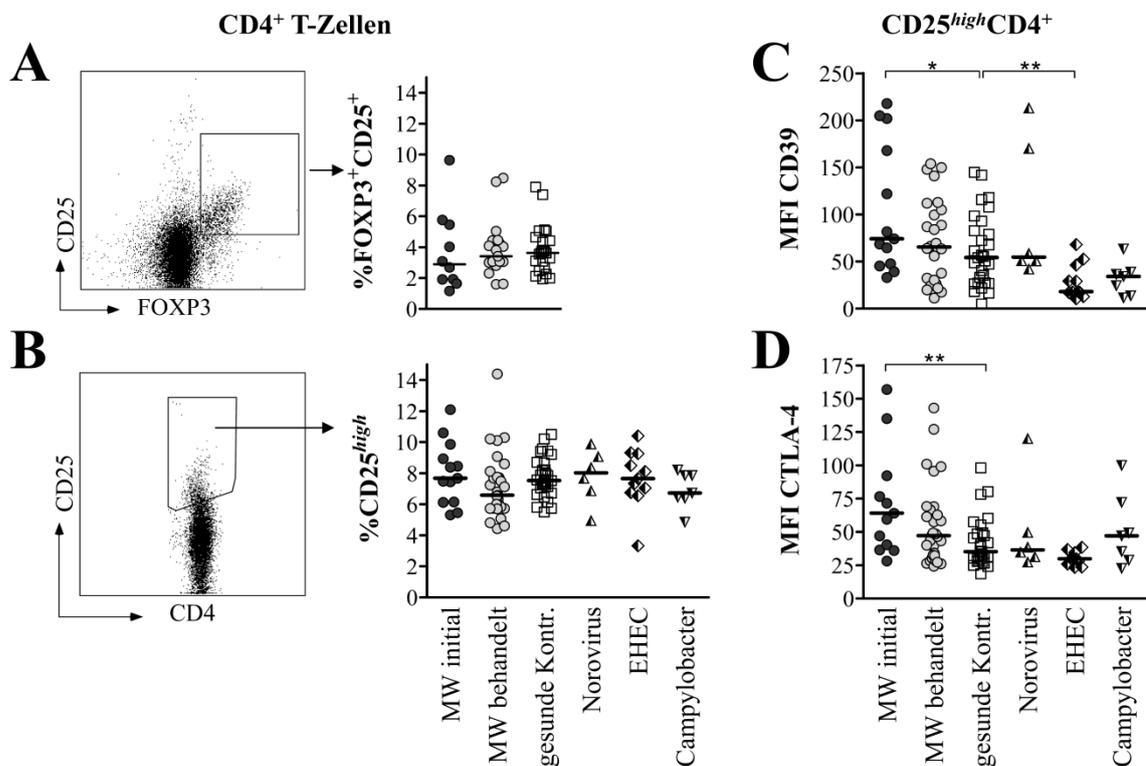


Abb. 3.22: Regulatorischer Phänotyp der CD4⁺ T-Zellen im Blut von MW-Patienten und Kontrollgruppen

Der Anteil der FOXP3⁺CD25⁺ (A) und CD25^{high} (B) Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Lymphozytenpopulation und die Expression von CD39 (C) und CTLA-4 (D) auf CD25^{high} CD4⁺ T-Zellen wurden im Blut von MW-Patienten initial und nach Behandlung sowie von gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit einer akuten Infektion durch Norovirus, EHEC oder Campylobacter durchflusszytometrisch bestimmt. B-D: Die Oberflächenfärbung von CD4, CD25, CD39 und CTLA-4 erfolgte direkt im Vollblut. A: Die intranukleäre Färbung von FOXP3 erforderte die Lyse der Erythrozyten, Fixierung und Permeabilisierung. Dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte. Der Medianwert ist jeweils als Linie eingezeichnet. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorier ANOVA und anschließendem Dunnett-Test für unabhängige Untersuchungsgruppen oder des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für gepaarte Daten von MW-Patienten initial und behandelt (* p-Wert < 0,05; ** p-Wert < 0,01).

Anders als im Duodenum, war in der Peripherie der Anteil der FOXP3⁺CD25⁺ T_{reg} innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation in MW-Patienten vor und nach Therapie nicht signifikant verändert im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (Abb. 3.22A). Allerdings kann der Transkriptionsfaktor FOXP3 nur in fixierten Zellen angefärbt werden. Da bestimmte Zielstellungen, wie die Isolation von T_{reg} für *in vitro* Versuche jedoch native Zellen erfordern, werden T_{reg} häufig anhand ihrer starken Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors als CD25^{high} CD4⁺ identifiziert. Aber auch der Anteil CD25^{high} Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation im Blut unterschied sich nicht signifikant zwischen MW-Patienten vor und nach Therapie und gesunden Kontrollpersonen sowie Patienten mit akuten intestinalen Infektionen durch Norovirus, EHEC oder Campylobacter (Abb. 3.22B). Der Ausschluss von aktivierten CD4⁺ T-Zellen in der CD25⁺-Population über deren charakteristische Expression des IL-7-Rezeptors (CD127), zeigte für die als CD25⁺CD127^{low/-} definierte T_{reg}-Population keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (Median von 6,0 % in MW initial, 6,0 % in MW behandelt und 7,1 % in gesunden Kontrollpersonen).

Allerdings war für die CD25^{high}CD4⁺ T-Zellen im Blut von unbehandelten MW-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen eine erhöhte Expression von CD39 (Abb. 3.22C) und CTLA-4 (Abb. 3.22D) auf der Zelloberfläche bezeichnend, welche beide mit einer verstärkten regulatorischen Aktivität assoziiert sind [393, 394, 247, 395]. Im Gegensatz zur chronischen Situation des MW, war die Expression von CD39 auf T_{reg} bei einem akuten Befall durch EHEC oder Campylobacter im Vergleich zu Gesunden sogar verringert (Abb. 3.22C). Die Expression von CTLA-4 auf T_{reg} war hingegen bei den untersuchten akuten Infektionen durch Norovirus, EHEC oder Campylobacter im Vergleich zu Gesunden nicht verändert (Abb. 3.22D).

Zwar war der Anteil der T_{reg} innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation im Blut von MW-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nicht verändert. Jedoch weist der Effektor-Phänotyp der zirkulierenden T_{reg} auf eine systemisch verstärkte regulatorische Aktivität in unbehandelten MW-Patienten hin.

Suppressive Aktivität der T_{reg} von MW-Patienten

Um die Funktionalität der T_{reg} von MW-Patienten zu überprüfen, wurden CD25⁺CD4⁺ (T_{reg}) Zellen von MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen hinsichtlich ihrer suppressiven Wirkung auf die Aktivierung von CD25⁻CD4⁺ (T_{eff}) Zellen verglichen. Dazu wurden T_{reg} aus dem Blut von MW-Patienten und gesunden Probanden mit derselben Altersverteilung isoliert und in verschiedenen Verhältnissen (1:2, 1:4, 1:8, 1:12) zu autologen, mit CFSE markierten T_{eff}-Zellen gegeben. Vier Tage nach der Stimulation mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern wurde die T_{eff}-Zellpopulation (Abb. 3.23A) hinsichtlich Proliferation (Abschwächung der CFSE-Fluoreszenz), Expression von CD69 auf der Zelloberfläche und Vorhandensein von intrazellulärem IFN- γ , IL-10 und IL-4 durchflusszytometrisch untersucht. Die Konzentration von sekretiertem IL-17A wurde mittels ELISA in Kulturüberständen gemessen.

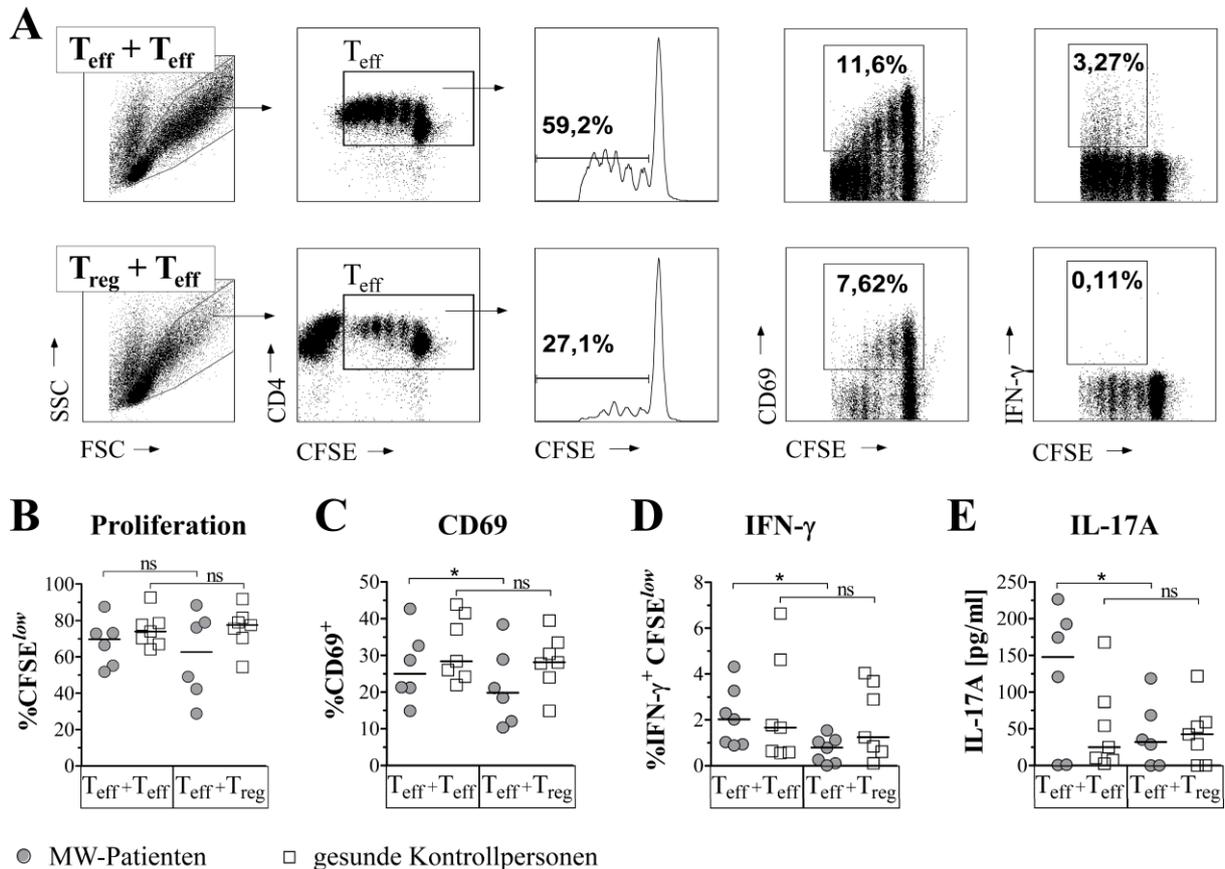


Abb. 3.23: Unspezifische Suppression der CD4⁺ T-Zellaktivierung durch T_{reg} aus MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen *in vitro*

Mit CFSE markierte CD25⁺CD4⁺ Effektor-T-Zellen (T_{eff}) aus behandelten MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurden entweder mit der gleichen Anzahl T_{eff} oder CD25⁺CD4⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) ko-kultiviert und mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern stimuliert. Nach vier Tagen Inkubation wurde die Aktivierung der T_{eff} durchflusszytometrisch analysiert (A-D). A zeigt die Analyse-Strategie an einem repräsentativen Beispiel. Lebende Zellen wurden anhand ihrer FSC/SSC-Eigenschaften eingegrenzt und CFSE⁻ Zellen (nicht markierte T_{reg}) wurden von der Analyse ausgeschlossen. Innerhalb der CFSE⁺ T_{eff}-Population wurden die Anteile der proliferierenden (CFSE^{low}) Zellen (B), der CD69 auf der Zelloberfläche exprimierenden (C) und der IFN- γ intrazellulär exprimierenden CFSE^{low} Zellen (D) bestimmt. E, Die Quantifizierung von IL-17A in Kulturüberständen erfolgte mittels ELISA. B-E: Dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte. Der Median-Wert ist jeweils als Linie eingezeichnet. Die statistische Analyse der gepaarten Daten erfolgte mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (* p-Wert < 0,05; ns, nicht signifikant).

Die Proliferation der T_{eff}-Zellen veränderte sich nicht unter dem Einfluss von T_{reg} aus MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen (Abb. 3.23B). Hingegen supprimierten die T_{reg} von MW-Patienten die Aktivierung der T_{eff} stärker als T_{reg} von gesunden Kontrollpersonen: Sowohl der Anteil der T_{eff}, die den Aktivierungsmarker CD69 auf der Zelloberfläche exprimieren, als auch der Anteil der IFN- γ -produzierenden T_{eff} nahm durch die Anwesenheit der T_{reg} von MW-Patienten, nicht aber durch T_{reg} von gesunden Kontrollpersonen, signifikant ab (Abb. 3.23C, D). Im Gegensatz zu T_{reg} von gesunden Kontrollpersonen, inhibierten T_{reg} von MW-Patienten die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-17A in das Kulturmedium um mehr als das Vierfache (Abb. 3.23E). Die T_{reg} beeinflussten jedoch nicht signifikant die Expression von IL-10 oder IL-4 in

T_{eff} -Zellen von MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen (Median % IL-10⁺ in „ T_{eff} + T_{eff} “ vs. „ T_{eff} + T_{reg} “: 3,2 % vs. 5,1 % bei Kontrollpersonen und 2,7 % vs. 2,3 % bei MW-Patienten; Median % IL-4⁺ in „ T_{eff} + T_{eff} “ vs. „ T_{eff} + T_{reg} “: 1,2 % vs. 1,1 % bei Kontrollpersonen und 2,4 % vs. 1,9 % bei MW-Patienten).

Zur Klärung der Frage, ob die suppressive Aktivität der T_{reg} selektiv gegen *T. whipplei*-spezifische T-Zellantworten gerichtet ist, wurde die Aktivierung *T. whipplei*-spezifischer T-Zellen in der $CD4^+$ -Gesamtpopulation und der T_{reg} -depletierten (T_{eff}) $CD4^+$ -Population untersucht.

Dazu wurden CFSE-markierte $CD4^+$ oder $CD25^-CD4^+$ (T_{eff}) Zellen von MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen zusammen mit autologen $CD4^{\text{low/-}}$ Zellen, die Antigen präsentierende Zellen enthielten, inkubiert und mit anti-CD28-Antikörpern und *T. whipplei*-Lysat stimuliert. Zum Ausschluss der unspezifischen T-Zellaktivität wurde jeweils ein Kontrollansatz ohne Antigen-Stimulus mitgeführt.

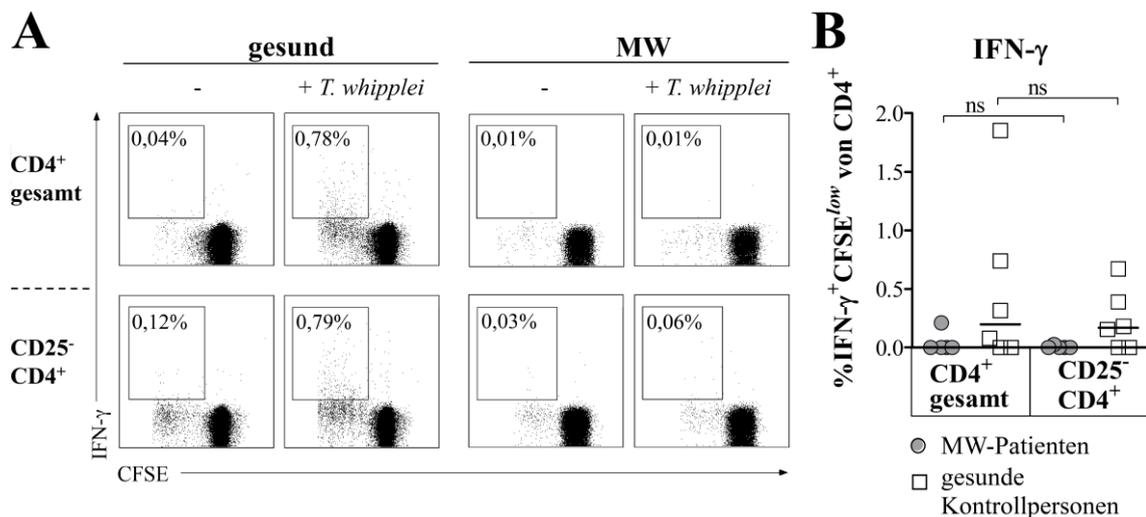


Abb. 3.24: Einfluss der T_{reg} auf die Aktivierung *T. whipplei*-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen *in vitro*

CFSE-markierte $CD4^+$ (gesamt) oder T_{reg} -depletierte ($CD25^-$) $CD4^+$ T-Zellen von behandelten MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurden in Anwesenheit von autologen $CD4^{\text{low}}$ Zellen, die Antigen präsentierende Zellen enthielten, mit *T. whipplei*-Lysat und anti-CD28 Antikörper stimuliert. Nach vier Tagen wurde die intrazelluläre Expression von IFN- γ in proliferierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dazu wurden lebende Zellen anhand ihrer FSC/SSC-Eigenschaften eingegrenzt und CFSE⁻ Zellen (nicht-markierte $CD4^{\text{low}}$) von der Analyse ausgeschlossen. A zeigt je ein repräsentatives Beispiel der unspezifischen (ohne Stimulus: „-“) und der *T. whipplei*-spezifischen Aktivität der $CD4^+$ T-Zellen von Gesunden und von MW-Patienten. B: Zur Bestimmung der *T. whipplei*-spezifischen IFN- γ -Produktion wurde jeweils die unspezifische T-Zellaktivität vom Wert der *T. whipplei*-spezifischen T-Zellaktivierung abgezogen. Dabei erhaltene Negativwerte wurden gleich „Null“ gesetzt. Dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte und der jeweilige Median-Wert. Die statistische Analyse unter Anwendung des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für die gepaarten Daten ergab keine signifikanten Unterschiede (ns, nicht signifikant).

Die Depletion der T_{reg} hatte keinen Einfluss auf die Proliferation, die CD69 Expression und die Induktion von IFN- γ in *T. whipplei*-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen von MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen (Median % CFSE^{low} in *T. whipplei*-stimulierten „ $CD4^{+cc}$ “ vs. „ $CD25^-CD4^{+cc}$ “: 5,6 % vs. 6,5 % bei Kontrollpersonen und 4,1% vs. 4,3% bei MW-Patienten; Median % CD69⁺ in „ $CD4^{+cc}$ “ vs. „ $CD25^-CD4^{+cc}$ “: 2,2 % vs. 0,9 % bei Kontrollpersonen und 0,6 % vs. 1,4 % bei MW-Patienten; Abb. 3.24A). Auch die Anteile IL-10 und IL-4 produzierender *T. whipplei*-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen von MW-Patienten und gesunden Kontrollpersonen änderten sich nicht signifikant durch die Entfernung der T_{reg} (Median % IL-10⁺ in *T. whipplei*-stimulierten „ $CD4^{+cc}$ “ vs. „ $CD25^-CD4^{+cc}$ “: 0,4 % vs. 0,1 % bei Kontrollpersonen und 0,3 % vs. 0,5 % bei MW-Patienten; Median % IL-4⁺ in „ $CD4^{+cc}$ “ vs. „ $CD25^-CD4^{+cc}$ “: 0 % vs. 0 % bei Kontrollpersonen und 0,2 % vs. 0,7 % bei MW-Patienten). Die Konzentration von IL-17A lag in den Überständen der mit *T. whipplei*-Lysat stimulierten $CD4^+$ und T_{eff} -Zellen von MW-Patienten und Kontrollpersonen unter der Nachweisgrenze.

Die Ergebnisse zeigen eine erhöhte regulatorische Aktivität der T_{reg} von MW-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die verstärkte suppressive Aktivität der T_{reg} war jedoch nicht spezifisch gegen *T. whipplei*-reaktive $CD4^+$ T-Zellen gerichtet.

3.2.4 Anergie und Hyporesponsivität zirkulierender $CD4^+$ T-Zellen in MW-Patienten

Die verminderte *T. whipplei*-spezifische Th1 Antwort in MW-Patienten (Abb. 3.10; [336]) könnte auf eine generelle Anergie der $CD4^+$ T-Zellen zurückzuführen sein, die durch das anti-inflammatorische Zytokinmilieu [338, 352], die verringerte stimulatorische Fähigkeit der DC (Abb. 3.10) und die verstärkte T_{reg} -Aktivität (Abb. 3.22, Abb. 3.23) induziert wird.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Oberflächenexpression des Proliferationsmediators GITR [261, 396], des Erschöpfungsmarkers PD-1 [285, 275] und des Apoptose-vermittelnden Rezeptors Fas (CD95) [397, 267] auf der Zelloberfläche der $CD4^+$ Effektor T-Zellpopulationen im Blut von MW-Patienten vor und nach Therapie und gesunden Kontrollpersonen mittels Durchflusszytometrie untersucht.

MW-Patienten zeigten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen einen erhöhten Anteil an aktivierten Effektorzellen ($CD25^+FOXP3^-$) in der $CD4^+$ Population im Blut (Abb. 3.25B). Der Anteil der GITR exprimierenden Zellen innerhalb dieser aktivierten $CD4^+$ Effektorzellen war bei MW-Patienten, unabhängig vom Behandlungsstatus, im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant verringert (Abb. 3.25C). Im Gegensatz dazu war der Anteil PD-1 exprimierender aktivierter $CD4^+$ Effektor-T-Zellen in MW-Patienten initial signifikant höher als in gesunden Kontrollpersonen, ging aber nach der Therapie auf Normalniveau zurück (Abb. 3.25D). Außerdem zeigten MW-Patienten initial eine erhöhte Expression von CD95 auf $CD45RO^+$ (Effektor-/Gedächtnis) $CD4^+$ T-Zellen, die nach der Antibiotika-Behandlung auf den Wert gesunder Kontrollpersonen absank (Abb. 3.25F).

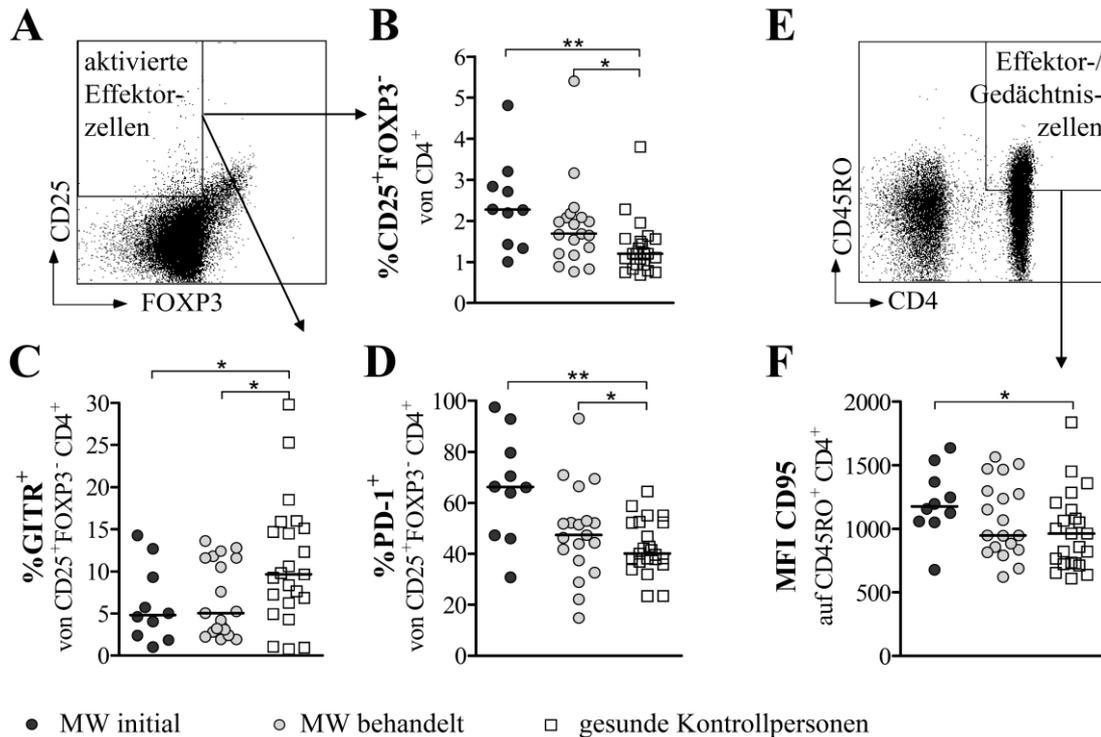


Abb. 3.25: Phänotypische Analyse von Anergie und Erschöpfung der $CD4^+$ Effektor-T-Zellen in MW-Patienten und Kontrollpersonen

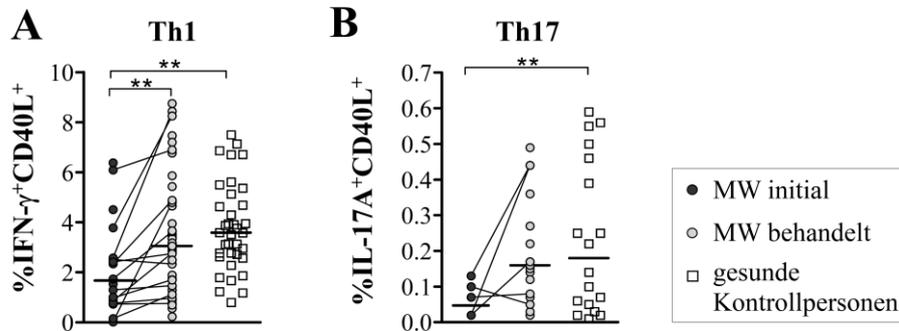
Der Phänotyp zirkulierender $CD4^+$ Effektor-T-Zellen wurde im Blut von MW-Patienten initial und nach Behandlung sowie gesunden Kontrollpersonen mittels Sieben-Farben-Durchflusszytometrie untersucht. $CD4$, $CD45RO$, $CD25$, $GITR$, $PD-1$ und $CD95$ wurden in lysiertem Vollblut nativ gefärbt. Nach der Fixierung und Permeabilisierung wurde $FOXP3$ intranukleär detektiert. *A* und *E* zeigen die Analysestrategie zur Eingrenzung der aktivierten Effektor ($CD25^+FOXP3^-$) (*A*) und der Effektor-/Gedächtnis- ($CD45RO^+$) (*E*) $CD4^+$ T-Zellen. *A-D*: Der Anteil der aktivierten Effektorzellen an der $CD4^+$ T-Zellpopulation (*B*) sowie der jeweilige Anteil der $GITR$ (*C*) und $PD-1$ (*D*) exprimierenden aktivierten $CD4^+$ Effektor-T-Zellen wurde bestimmt. *F*: Die Expression von $CD95$ wurde auf $CD45RO^+CD4^+$ Effektor-/Gedächtniszellen gemessen. Dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte mit dem jeweiligen Median-Wert. Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests (* p-Wert < 0,05; ** p-Wert < 0,01).

Zur Bestätigung der phänotypisch beobachteten T-Zellanergie in MW-Patienten wurden die Th1- und die Th17-Antwort im Vollblut nach polyklonaler Aktivierung mit dem Superantigen SEB untersucht und jeweils mit der Antwort in gesunden Kontrollpersonen verglichen. Außerdem wurde die Antigen-spezifische Th1-Antwort auf *T. whipplei*, CMV und Tuberkulin im Blut von MW-Patienten mit unterschiedlichem Behandlungsstatus und gesunden Kontrollpersonen analysiert. Dabei ermöglichte die Gegenfärbung von $CD40$ -Ligand, spezifisch aktivierte $CD4^+$ T-Zellen zu identifizieren [162].

Die $CD4^+$ T-Zellen im Blut von unbehandelten MW-Patienten zeigten auf den SEB-Stimulus eine deutlich verringerte Produktion von $IFN-\gamma$ (Abb. 3.26A) und $IL-17A$ (Abb. 3.26B) im Vergleich zu $CD4^+$ T-Zellen von gesunden Kontrollpersonen. Auch die CMV- und Tuberkulin-spezifische Produktion von $IFN-\gamma$ war in MW-Patienten initial im Vergleich zu Gesunden reduziert (Abb. 3.26D, E). Die *T. whipplei*-spezifische Th1 Aktivität war in MW-Patienten unabhängig vom Behandlungsstatus stark vermindert bzw. fehlte ganz (Abb. 3.26C). Im Gegensatz dazu konnten

sowohl die polyklonalen Th1- und Th17-Antworten (Abb. 3.26A, B) als auch die spezifischen Th1-Antworten gegen die *Recall*-Antigene CMV und Tuberkulin in MW-Patienten durch die Therapie wiederhergestellt werden (Abb. 3.26D, E).

Polyklonale Th-Antwort:



Antigen-spezifische Th1-Antwort:

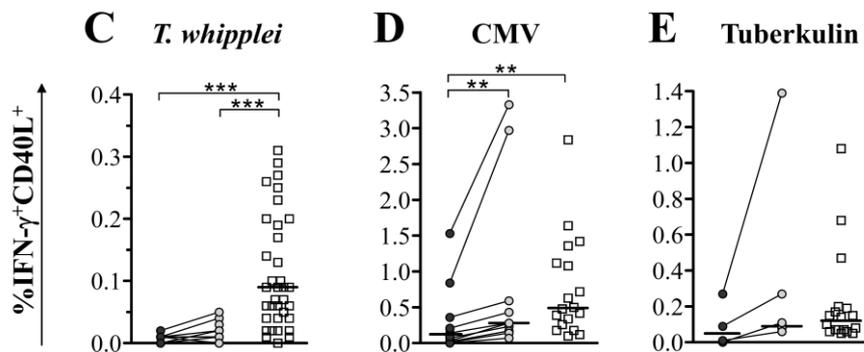


Abb. 3.26: Polyklonale und Antigen-spezifische T-Zellantworten in MW-Patienten

Vollblut von MW-Patienten vor und nach Therapie und von gesunden Kontrollpersonen wurde 6 h mit 2 µg/ml SEB (A,B), *T. whipplei*-Lysat (10⁷ Bakterien/ml) (C), CMV (1,5 µg/ml) (D) oder Tuberkulin (60 TE/µl) (E) inkubiert. C-E: Zur Verstärkung der Antigen-spezifischen Reaktion wurden Antikörper gegen CD28 (2 µg/µl) und CD49d (2 µg/µl) verwendet. Die Anteile CD40L⁺IFN-γ⁺ (A,C-E) und CD40L⁺IL-17A⁺ (B) Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation wurden durchflusszytometrisch bestimmt. D,E: In die Analyse der Antwort auf *Recall*-Antigene wurden nur Personen eingeschlossen, die eine deutliche Reaktion auf CMV (D) oder Tuberkulin (E) zeigten (% CD40L⁺IFN-γ⁺ ≥ 0,05). Dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte, die Verbindungslinien zwischen den gepaarten Werten aus denselben Patienten sowie der jeweilige Median-Wert der Gruppe. Zur statistischen Analyse wurden für ungepaarte Werte der Mann-Whitney-U-Test (A,C-E), für ungleiche Varianzen die Welch-Korrektur (B) und für die gepaarten Werte der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (A-E) angewendet (* p-Wert < 0,05; ** p-Wert < 0,01; *** p-Wert < 0,001).

Die Ergebnisse (Abb. 3.26) zeigen, dass CD4⁺ Effektor-T-Zellen in Patienten mit einem unbehandelten MW anerg sind und dass diese allgemeine Hyporesponsivität durch die Antibiose weitgehend aufgehoben werden kann. Im Gegensatz dazu bleibt die fehlende *T. whipplei*-spezifische T-Zellantwort in MW-Patienten auch nach der Behandlung bestehen.

4 Diskussion

4.1 Ausgangsfragestellung

Die chronische Form der Infektion mit *T. whipplei*, der MW, tritt selten auf [289], wenngleich akute selbst-limitierende *T. whipplei*-Infektionen weit verbreitet sind [333, 334] und zu einer protektiven Immunität führen [336, 311]. Daher scheinen subtile Immundefekte für eine Persistenz und systemische Ausbreitung von *T. whipplei* zu prädisponieren [287]. Die in MW-Patienten systemisch reduzierte Konzentration von IL-12p40 [353], die allgemein verringerte Th1-Aktivität [354] und die fehlende *T. whipplei*-spezifische Th1-Antwort [336] deuten auf Defekte in der adaptiven Zellvermittelten Immunabwehr hin. Da MW-Patienten trotz der massiven und systemischen Besiedlung mit *T. whipplei* lediglich eine moderate Entzündungsreaktion zeigen [338], scheinen zudem regulatorische Mechanismen zu wirken.

Obwohl DC für die Initiierung protektiver T-Helferzellantworten zur Abwehr pathogener Bakterien entscheidend sind [20], war ihre Rolle in der Pathogenese des MW bislang unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb geprüft, ob ein Mangel oder ein funktioneller Defekt der DC in MW-Patienten für die Persistenz der *T. whipplei*-Infektion verantwortlich sein könnte. Hierfür wurden die Zusammensetzung und der Phänotyp der DC-Population im Blut und die Verteilung der DC in Geweben von MW-Patienten und Kontrollgruppen untersucht und miteinander verglichen. Des Weiteren wurde die Funktionalität der DC von MW-Patienten - im Vergleich zu DC von gesunden Kontrollpersonen - im Vollblut *ex vivo* und in Mo-DC *in vitro* überprüft und der Einfluss von *T. whipplei* auf die Reifung und Funktion der DC bestimmt.

Um der Frage nachzugehen, inwiefern Regulationsmechanismen zum chronischen Verlauf der *T. whipplei*-Infektion beitragen, wurden Veränderungen der CD4⁺ T-Zellpopulation im Blut und Duodenum analysiert, welche die Aktivierung oder die Suppression von T-Zellantworten widerspiegeln. Da T_{reg} für die Kontrolle entzündlicher Prozesse bei chronischen Infektionen essenziell sind [398, 399, 400], wurde eine mögliche Beteiligung von T_{reg} an der Pathogenese des MW überprüft. Dazu wurde die T_{reg}-Population in der duodenalen Mukosa und in Lymphknoten von MW-Patienten mit der von Kontrollgruppen verglichen. Außerdem wurden T_{reg} aus dem peripheren Blut von MW-Patienten phänotypisch und hinsichtlich ihrer suppressiven Eigenschaften gegenüber CD4⁺ Effektor-T-Zellen untersucht.

4.2 Dendritische Zellen im peripheren Blut von Morbus Whipple-Patienten

Die Zusammensetzung und der Phänotyp der DC-Population in der Peripherie wurden vorzugsweise direkt im Vollblut untersucht, da die Anreicherung von PBMC mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation zu einem Verlust myeloider Zellpopulationen führt, wodurch sich das Verhältnis von M-DC und P-DC zugunsten der P-DC verschiebt (Abb. 3.1) [401, 378, 54, 402].

Bei vielen systemischen Erkrankungen sind Veränderung der DC-Population im Blut mit dem Krankheitsverlauf assoziiert [403, 54, 404, 405]. Eine Abnahme der DC-Population im Blut wurde für Infektionen mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) [403, 377] und Hepatitis C Virus (HCV) [405], ANCA-assoziierte Vaskulitiden [378], Arthritiden [401], Sarkoidose [406] und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen [54] beschrieben, wohingegen eine bakterielle Sepsis mit einem erhöhten Anteil inflammatorischer slanDC verbunden ist [42]. Auch MW-Patienten zeigten initial eine selektive Reduktion der CD11c⁺ M-DC-Population im Blut (Abb. 3.1) ebenso wie Patienten mit Tuberkulose, einer chronischen Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* [404, 407].

Die transiente Reduktion der M-DC-Population in MW-Patienten könnte auf eine chronische Aktivierung durch zirkulierende Entzündungsmediatoren zurückzuführen sein, die zur Erschöpfung und Apoptose der DC führt [385]. Beispielsweise ist bei Patienten mit rheumatoider Arthritis eine erhöhte Serumkonzentration des Entzündungsmarkers C-reaktives Protein mit einer Verringerung der M-DC-Population assoziiert [401]. Auch MW-Patienten zeigen im Serum einen Anstieg des C-reaktiven Proteins [290] und des entzündlichen Zytokins IL-6 (unveröffentlichte Daten von A. Geelhaar). Es ist ebenfalls vorstellbar, dass die Infektion mit *T. whipplei* in den M-DC Apoptose induziert, wie es bereits für infizierte Makrophagen *in vitro* gezeigt werden konnte [344]. Entsprechend weisen MW-Patienten vor Therapiebeginn und bei Rezidiven eine erhöhte Konzentration von Apoptose-Markern im Serum auf [349]. Die Verringerung der M-DC-Population im Blut der MW-Patienten könnte aber auch auf einen mangelnden Nachschub an CD34⁺ DC-Vorläufern aus dem Knochenmark beruhen [362], ein Phänomen, das bei chronischen HCV-Infektionen [405] beschrieben wurde. Dafür spricht, dass im Vollblut von unbehandelten MW-Patienten die P-DC-Population ebenfalls leicht, wenn auch nicht signifikant reduziert war (Abb. 3.1). Diese Hypothese müsste in zukünftigen Arbeiten überprüft werden, beispielsweise über die Bestimmung der Anzahl CD34⁺ DC-Vorläufer im Blut [362] oder der Serumkonzentration des Wachstumsfaktors Fms-like Tyrosinkinase 3-Ligand (Flt3L), welcher für die Expansion und Differenzierung der DC erforderlich ist [46, 52].

Eine Aktivierung und die damit verbundene Rekrutierung in Gewebe oder Lymphknoten könnte ebenfalls die Verringerung der M-DC-Population im Blut bedingen. So weisen zirkulierende M-DC bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen oder einer HIV-Infektion eine erhöhte Reifung, insbesondere eine verstärkte CD86-Expression auf [54, 408]. Im Blut von MW-Patienten zeigten M-DC und P-DC hingegen, trotz der chronischen Infektion, einen unreifen Phänotyp (Abb. 3.2), der auch für die DC-Population in gesunden Individuen charakteristisch ist [53, 409]. Auch die

Oberflächenexpression von CCR7 war auf zirkulierenden M-DC und P-DC von MW-Patienten nicht signifikant erhöht (Abb. 3.2). Daher scheint bei MW-Patienten keine verstärkte Einwanderung von DC aus dem Blut in die Lymphknoten zu erfolgen, was durch die Quantifizierung verschiedener DC-Populationen in Lymphknoten von MW-Patienten bestätigt werden konnte (Abb. 3.16). Die Expression von Chemokinrezeptoren, welche die Einwanderung in entzündliche Gewebe vermitteln, war bei M-DC und P-DC im Blut von unbehandelten MW-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen differenziell verändert (Abb. 3.2): M-DC zeigten eine normale Expression von CCR2, CCR5 und CX₃CR1, aber eine verringerte Expression von CCR6, wohingegen P-DC selektiv weniger CCR5 exprimierten, was auf ein verändertes Migrationsverhalten der M-DC und P-DC hindeutet [21]. Penna und Kollegen beschrieben jedoch, dass P-DC trotz der Expression von CCR5 eine verringerte Migrationsfähigkeit in Reaktion auf CCR5-Liganden besitzen, sich aber durch eine höhere Expression von CCR7 als M-DC auszeichnen und damit in der Lage sind, direkt aus dem Blut in die Lymphknoten einzuwandern [410]. Zudem existieren kontroverse Daten im Hinblick auf die Notwendigkeit von CCR2, CCR5 oder CCR6 für die Migration in entzündliche Gewebe, so dass eine redundante Funktion dieser Chemokinrezeptoren denkbar ist [73, 118, 411, 412]. Darüber hinaus ist im humanen System weitestgehend unerforscht, ob die im Blut zirkulierenden unreifen M-DC und P-DC tatsächlich ins Gewebe migrieren. Ebenso könnten sie für die Aufnahme von Mikroben dauerhaft im Blut verbleiben oder bereits aus dem Gewebe ausgetretene DC repräsentieren, die über die Blutzirkulation entweder ins Knochenmark oder über Hochendothelvenolen in periphere Lymphknoten einwandern [413, 112]. Die Anzahl der CD1c⁺ M-DC1 ist im Duodenum generell gering, CD141⁺ M-DC2 wurden nur im Colon gefunden und das Vorkommen von P-DC (BDCA-2⁺) im Darm ist umstritten [414, 415, 57]. Dagegen sind P-DC, M-DC1 und M-DC2 in lymphatischen Geweben präsent [38, 57, 50].

4.3 Populationen dendritischer Zellen in Geweben von Morbus Whipple-Patienten

Bei Infektionen im Darm spielen myeloide DC-Populationen eine entscheidende Rolle, da sie im Gewebe Antigene aufnehmen und zu den drainierenden Lymphknoten transportieren, um dort eine adaptive Immunantwort zu initiieren [84].

Zur immunhistochemischen Identifizierung der DC-Population in humanem Gewebe existiert jedoch kein einzelner spezifischer Marker. Anders als im Mausmodell, wird CD11c im Menschen auch von Monozyten und Makrophagen exprimiert [67] und die Expression von CD1c beschränkt sich nicht nur auf M-DC1, sondern markiert ebenfalls B-Lymphozyten [47, 57]. Zudem standen für die retrospektiven Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit lediglich Formalin-fixierte und in Paraffin-eingebettete Gewebepreparate zur Verfügung, auf denen kommerziell erhältliche Antikörper gegen DC-Marker, die für die durchflusszytometrische Analyse verwendet wurden (CD1c für M-DC, CD123

oder BDCA-2 für P-DC, CD83 für reife DC), aufgrund der irreversiblen Epitopmaskierung nicht binden. Aus diesen Gründen wurden interstitielle DC in Geweben von MW-Patienten und Kontrollpersonen über die Expression von DC-SIGN [58] und S-100 [59] identifiziert. Interdigitierende DC im Lymphknoten sowie Langerhanszellen der Haut wurden über die Expression von CD1a [63] oder S-100 [57] und reife DC in Dermis und Lymphknoten über die Expression von DC-LAMP [64] nachgewiesen.

In der Literatur werden DC-SIGN⁺ Zellen kontrovers entweder als DC [416, 417, 63, 386] oder als Gewebsmakrophagen beschrieben [418, 419, 414, 420]. Tatsächlich scheint es sich bei DC-SIGN⁺ Zellen um eine heterogene Population Antigen präsentierender Zellen zu handeln, die DC und Makrophagen umfasst und sich durch die Aufnahme von Antigenen auszeichnet [417, 420, 421]. In MW-Patienten zeigten duodenale Makrophagen, die mit *T. whipplei* gefüllt und stark vergrößert waren, jedoch einen CD163⁺CD68⁺CD11c⁺HLA-DR⁺ Phänotyp (nicht gezeigte Daten) und lediglich eine schwach granuläre Expression von DC-SIGN und S-100 im Zytoplasma. Dagegen zeichneten sich DC neben der typischen Morphologie mit langen Ausläufern auch durch eine deutliche Expression von DC-SIGN bzw. S-100 in der gesamten Zelle aus (Abb. 3.12) und trugen, im Gegensatz zu Makrophagen, nur einzelne *T. whipplei*-Bakterien (Abb. 3.15).

Dendritische Zellen in der duodenalen Mukosa

In der duodenalen Mukosa von MW-Patienten war die Anzahl der DC-SIGN⁺ und S-100⁺ DC im Vergleich zu Kontrollpersonen nicht verändert (Abb. 3.12). Dies deutet darauf hin, dass im Darm von MW-Patienten keine oder nur eine schwache Entzündungsreaktion stattfindet. Entsprechend zeigten MW-Patienten im Duodenum sogar eine reduzierte Anzahl CD4⁺ und CD45RO⁺ Effektorzellen im Vergleich zu Kontrollpersonen mit unauffälligem Befund. Im Gegensatz dazu wurde für entzündliche Darmerkrankungen wie Zöliakie, Morbus Crohn oder ulzerative Colitis eine Akkumulation von aktivierten DC mit Th1-polarisierendem Potenzial im Darm beschrieben [414, 415, 422, 417]. Patienten mit einer akuten *Campylobacter*-induzierten Colitis zeigen eine erhöhte Aktivierung der DC in der Darmmukosa, die mit einer Zerstörung der Epithelschicht assoziiert ist [423]. Auch für *Helicobacter pylori*-Infektionen wurde eine Rekrutierung von unreifen DC und T-Lymphozyten mit einem CD45RO⁺ Effektor-/Gedächtnis-Phänotyp in die Magenschleimhaut beschrieben [412]. Der MW scheint die einzige chronische Infektionskrankheit zu sein, die über Jahrzehnte hinweg zu einer derart massiven Besiedlung des Duodenums durch Bakterien führt ohne eine starke Entzündungsreaktion auszulösen [289].

Die Infektionsversuche mit Duodenalbiopsien in der Ussing-Kammer zeigten, dass *T. whipplei* nicht nur bei MW-Patienten sondern auch bei Kontrollpersonen die duodenale Epithelschicht durchdringt und in der Lamina propria entweder extrazellulär verbleibt oder in Antigen präsentierende Zellen gelangt (Abb. 3.13 und unveröffentlichte Daten von J. Friebe). Ob *T. whipplei* aktiv die Zellen penetriert oder von Antigen präsentierenden Zellen internalisiert wird, bleibt zu klären. Diese Arbeit weist jedoch erstmals darauf hin, dass neben Makrophagen, in denen sich *T. whipplei* in

MW-Patienten scheinbar ungehindert vermehrt, auch DC-SIGN⁺ unreife DC im Duodenum an der Aufnahme von *T. whipplei* beteiligt sind. Einzelne DC-SIGN⁺ Zellen befanden sich direkt unterhalb der Epithelschicht (Abb. 3.13), weswegen naheliegt, dass sie als erste „Wächter“ mit eingedrungenen *T. whipplei* in Kontakt treten und diese internalisieren. Es ist beschrieben, dass murine und humane DC *in vitro* Epithelschichten durchdringen [83, 424] und dass DC der Lamina propria im Mausmodell auch *in vivo* Dendriten in das Darmlumen aussenden, um dort direkt Bakterien aufzunehmen [425]. In der vorliegenden Arbeit wurden DC-SIGN⁺ Zellen beobachtet, deren Ausläufer in die Epithelschicht hinein, jedoch nicht bis ins Darmlumen reichten.

Die Präsenz von DC-SIGN⁺ und S-100⁺ DC im Duodenum von unbehandelten MW-Patienten war mit deren Auftreten in mesenterialen Lymphknoten assoziiert (Abb. 4.1), was auf eine kontinuierliche Migration der DC aus der Lamina propria in die drainierenden Lymphknoten hindeutet. Da die Lebensdauer der DC im Gewebe lediglich wenige Tage beträgt [52] und aktivierte DC aus dem Gewebe in die drainierenden Lymphknoten auswandern, ist ein ständiger Nachschub erforderlich, um die DC-Population in der duodenalen Mukosa aufrecht zu erhalten.

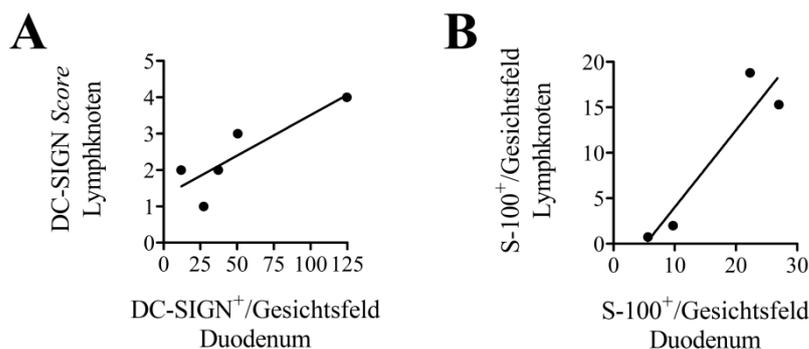


Abb. 4.1: Zusammenhang der DC-Zahl in Duodenum und mesenterialen Lymphknoten von MW-Patienten

Dargestellt ist die Beziehung der Anzahl DC-SIGN⁺ (A; Score in Abb. 3.16 erklärt) bzw. S-100⁺ (B) DC in der duodenalen Lamina propria und den dazugehörigen mesenterialen Lymphknoten von 4-5 unbehandelten MW-Patienten. Jeder Punkt repräsentiert einen MW-Patienten und die lineare Regressionsgerade zeigt die Tendenz zu einer positiven Assoziation.

Studien in Mäusen zeigten, dass im Blut zirkulierende Monozyten in peripheren Geweben zu DC differenzieren können [426], welche durch die Expression von DC-SIGN gekennzeichnet sind [384]. Für eine Rekrutierung von Monozyten in den Darm spricht bei MW-Patienten der erhöhte Anteil DC-SIGN⁺ mononukleärer Zellen im Blut, die verstärkte Expression des Darm-*Homing*-Moleküls Integrin $\beta 7$ auf zirkulierenden Monozyten und die gesteigerte Expression des CCR2-Liganden im Duodenum (unveröffentlichte Daten unserer Gruppe; [338]). Diese Hypothese müsste in folgenden Arbeiten durch den Nachweis eingewanderter CD14⁺ Monozyten in Duodenalbiopsien überprüft werden.

Dendritische Zellen in peripheren Geweben

Auch in der Synovialmembran eines symptomatischen Kniegelenks sowie in der Haut von MW-Patienten waren DC mit intrazellulären *T. whipplei*-Bakterien nachweisbar (Abb. 3.14). Dies verdeutlicht zum einen die systemische Ausbreitung von *T. whipplei* im gesamten Organismus und zum anderen, dass unreife DC im Gewebe kontinuierlich *T. whipplei* aufnehmen.

In der entzündlichen Synovialmembran der MW-Patienten wurden ausschließlich DC-SIGN⁺, aber keine S-100⁺, DC-LAMP⁺ oder CD1a⁺ DC detektiert (Abb. 3.14). Auch bei Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden Infiltrationen von pro-inflammatorischen slanDC und DC-SIGN⁺ Zellen in der Synovialmembran beschrieben [41, 418]. Diesen in Geweben gefundenen Zellpopulationen ist gemein, dass sie von Blut-Monozyten abstammen und den Makrophagen-Marker CD68 exprimieren [41, 418]. Obwohl CD68 als allgemeiner Marker für Makrophagen verwendet wird, sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass auch aus Monozyten oder CD34⁺ Vorläufern hervorgegangene DC das lysosomale Glykoprotein CD68 exprimieren [427, 64]. So führt die überlappende Expression von DC- und Makrophagen-Markern bei histologischen Färbungen zu verschiedenen Interpretationen [418, 67, 428, 41, 420]. Aus diesem Grund wurden Makrophagen in dieser Arbeit über die Expression des *Scavenger*-Rezeptors CD163 [429] (anstatt über CD68) von DC abgegrenzt (Abb. 3.15) [386].

Während 80 % der MW-Patienten unter Gelenksbeschwerden leiden, sind symptomatische Hautmanifestationen selten [430]. Dennoch zeigen 85 % der MW-Patienten in Hautproben ein *T. whipplei*-positives PCR-Ergebnis [430]. Im Gegensatz zur Synovialmembran, in der ausschließlich DC-SIGN⁺ DC detektiert wurden, befanden sich in Hautproben von MW-Patienten neben DC-SIGN⁺, auch CD1a⁺ und S-100⁺ DC sowie vereinzelt DC-LAMP⁺ reife DC mit intrazellulären *T. whipplei* in der Dermis (Abb. 3.14). In der Haut waren keine vergrößerten mit *T. whipplei* gefüllten Makrophagen zu erkennen. Entsprechend ist *T. whipplei* mittels PAS-Färbung nur bei 23 % der WM-Patienten in der Haut histologisch nachweisbar [430]. Die Präsenz von CD1a⁺, S-100⁺ und DC-LAMP⁺ reifen DC könnte die Vermehrung von *T. whipplei* in der Dermis beschränken, scheint jedoch nicht auszureichen, um eine protektive Immunität zu induzieren. Die für MW-Patienten beschriebene Reduktion der Hautreaktion gegenüber *Recall*-Antigenen wie Tetanustoxoid, Tuberkulin und Diphtherietoxin [354] spricht dafür, dass die chronische Anwesenheit von *T. whipplei* auch in der Haut zur Anergie führt. In der Literatur finden sich zudem Hinweise für eine mögliche tolerogene Funktion von DC-SIGN⁺ unreifen DC in der Haut. Krutzik und Kollegen entdeckten in Haut-Läsionen von Lepra-Patienten mit einer tuberkulösen milderer Form der Krankheit sowohl CD1b⁺ als auch DC-SIGN⁺ DC monozytären Ursprungs, während Patienten mit der schwerwiegenderen lepromatösen Form ausschließlich DC-SIGN⁺ Zellen mit intrazellulären Mykobakterien zeigten [428].

Dendritische Zellen in Lymphknoten

Die chronische Infektion mit *T. whipplei* führte in Lymphknoten von MW-Patienten nicht nur zu einer Vergrößerung (Lymphadenopathie) infolge der Immunaktivierung, sondern auch zu Veränderungen der charakteristischen Architektur. Je nach Ausprägung der Veränderungen konnten drei Lymphknoten-Stadien unterschieden werden (Tab. 3.2).

Lymphknoten im Stadium I waren durch eine schwache Immunaktivierung und intakte Keimzentren gekennzeichnet. Je nach Fortschreiten der Infektion befand sich *T. whipplei* entweder im Lymphknoten-Gewebe verstreut (Stadium Ia) oder in den Keimzentren (Stadium Ib). Es ist wahrscheinlich, dass *T. whipplei* über Antigen präsentierende Zellen wie DC, Monozyten und Makrophagen in die T-Zell-Areale der Lymphknoten transportiert wird. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für die chronische Infektion mit *Helicobacter pylori* im Menschen [431] und mit *Mycobacterium tuberculosis* im Mausmodell beschrieben [432]. Es könnte eine Überlebensstrategie von *T. whipplei* sein, in die Keimzentren einzuwandern (Tab. 3.2, Abb. 3.15) und dort an die Oberfläche follikulärer DC zu binden, um dem Abbau durch Phagozyten zu entgehen. So wurde beschrieben, dass follikuläre DC infektiöses HIV über Monate aufbewahren und auf andere Zellen übertragen können [433]. Mit dem Fortschreiten der *T. whipplei*-Infektion gehen die Keimzentren schließlich zugrunde. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die follikulären DC selbst apoptotisch werden oder *T. whipplei* auf Lymphozyten übertragen, welche ihrerseits in Apoptose übergehen. Die befallenen Keimzentren könnten aber auch durch die Aktivität zytotoxischer Zellen zerstört werden [16] oder aufgrund eines Mangels an entzündlichen Zytokinen in MW-Patienten [355, 353, 352] degenerieren.

Die Lymphknoten-Stadien II und III stellen in MW-Patienten verschiedene Entwicklungsmöglichkeiten aus Stadium I dar und sind durch das Fehlen von Keimzentren gekennzeichnet. Je nach Lokalisation des Lymphknotens und Grad der Infiltration mit *T. whipplei*-gefüllten Makrophagen bilden sich Lymphangiektasien (Stadium II) oder Granulome (Stadium III) (Tab. 3.2). Die drei untersuchten Lymphknoten im Stadium II waren von mesenterialer Herkunft. Vermutlich wurden hier die afferenten Lymphgefäße durch unbewegliche mit *T. whipplei* gefüllte und vergrößerte Makrophagen aus dem Duodenum blockiert. Diese können einen Lymphstau verursachen, welcher schließlich zur Erweiterung der Lymphgefäße (Lymphangiektasie) bis hin zur Zerstörung des Lymphgewebes führt [339]. Es ist vorstellbar, dass die Verstopfung der Lymphkanäle durch vergrößerte Makrophagen die Einwanderung der DC aus dem Duodenum in die drainierenden Lymphknoten behindert und so die in Lymphknoten des Stadiums II beobachtete Verringerung der DC-Populationen bedingt (Abb. 3.15, Abb. 3.16).

Die für Lymphknoten im Stadium III charakteristischen Sarkoidose-ähnlichen Granulome sind ein Anzeichen für die veränderte zelluläre Immunfunktion [434]. Dabei bildet sich um den Infektionsherd ein Abwehrwall aus Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen, DC und Lymphozyten, der einerseits den Erreger vom übrigen Gewebe abgrenzt und andererseits bakterizide Substanzen lokal konzentriert

[404, 435]. Da sich in Lymphknoten des Stadiums III nur vereinzelte *T. whipplei* befanden, ist zumindest eine teilweise lokale Kontrolle der Infektion durch die granulomatöse Reaktion anzunehmen. Die Granulome in Lymphknoten von MW-Patienten waren von CD1a⁺ und S-100⁺ DC umgeben (Abb. 3.15), die regulatorische Funktionen übernehmen und das Granulom so vor der Zerstörung durch T-Zellen schützen könnten, wie es auch für Granulome infolge einer Listerien-Infektion beschrieben wurde [435]. Denn im Gegensatz zu Granulomen, die sich bei einer persistierenden Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* ausbilden, zeigten die Granulome in Lymphknoten von MW-Patienten keine Gewebsnekrose [434, 404] (Tab. 3.2, Abb. 3.15).

Aufgrund der kurzen Lebensdauer der reifen DC von zwei bis drei Tagen geben die Anzahl und der Phänotyp der DC in den T-Zell-Arealen der Lymphknoten Auskunft über die vorherrschenden Bedingungen in den drainierten Geweben [160].

In Übereinstimmung mit anderen Forschungsgruppen, wurden DC-SIGN⁺ Zellen in dichten Netzwerken um Markstränge herum, subkapsulär und auch vereinzelt in paracortikalen Bereichen gefunden [67, 57, 436] (Tab. 3.1, Abb. 3.15). Dort bildeten die DC-SIGN⁺ Zellen eine heterogene Population aus CD163⁺ und S-100⁺ Zellen (nicht gezeigte Daten). In verschiedenen Arbeiten werden DC-SIGN⁺ Zellen im Lymphknoten zudem durch eine geringe Expression von HLA-DR und kostimulatorischen Molekülen charakterisiert [67, 436, 420]. Deshalb scheint es sich bei DC-SIGN⁺ Zellen unter anderem um unreife DC zu handeln, deren Funktion vorrangig in der Antigenaufnahme besteht.

Entsprechend den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, handelt es sich bei den S-100⁺ Zellen im Lymphknoten, die sich vor allem in T-Zell-Arealen des Paracortex, aber selten in den Keimzentren befanden (Tab. 3.1, Abb. 3.15), um reife DC [67, 57]. Takahashi und Kollegen beschrieben, dass S-100⁺ DC im Lymphknoten die kostimulatorischen Moleküle CD83 und CD86 exprimieren und Aggregate mit B- und T-Lymphozyten bilden [437]. Aber auch reife Mo-DC, die zu therapeutischen Zwecken in Lymphknoten von Tumor-Patienten injiziert wurden, exprimierten S-100 und lokalisierten in T-Zell-Arealen [438].

Das Glykoprotein CD1a wird nicht nur von Langerhanszellen der Haut, sondern auch von myeloiden DC-Vorläufern im Blut [62], Mo-DC [82] und interdigitierenden DC [63] exprimiert. Die Doppelfärbung von CD1a und S-100 im Lymphknoten ergab, dass CD1a⁺ DC auch S-100 exprimieren (nicht gezeigte Daten). Loré und Kollegen fanden CD1a⁺ DC in parafollikulären Bereichen von lymphatischen Geweben kolokalisiert mit den kostimulatorischen Molekülen CD40, CD80 oder CD86 [63], was auf einen ausgereiften Zustand dieser DC-Population schließen lässt. Andere Arbeitsgruppen wiesen CD1a⁺ DC lediglich in peripheren Lymphknoten nach und spekulierten, dass es sich um Langerhanszellen handeln könnte, die über die Dermis in die angrenzenden Lymphknoten eingewandert sind [57, 437]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden CD1a⁺ DC jedoch nicht nur in den in T-Zell-Arealen (Tab. 3.1) von peripheren Lymphknoten (pLK) sondern auch - wenngleich deutlich

verringert - in mesenterialen Lymphknoten (mLK) von MW-Patienten und Kontrollpersonen gefunden (Median von CD1a⁺ Zellen/Gesichtsfeld: MW initial 25 in pLK vs. 1 in mLK, Kontrollpersonen 40 in pLK vs. 27 in mLK). Da weder in der Synovialmembran noch im Duodenum CD1a⁺ Zellen detektiert wurden, könnte es sich bei den CD1a⁺ DC in den Lymphknoten entweder um residente DC oder über Blutstrom und Hochendothelvenolen eingewanderte DC handeln [62].

Die DC-LAMP⁺ Zellen bildeten eine weitere Population interdigitierender DC im Lymphknoten (Tab. 3.1). De Saint-Vis und Kollegen beschrieben, dass DC-LAMP⁺ Zellen CD83 und CD40 exprimieren, aber eine von den CD1a⁺ DC getrennte DC-Population darstellen [64]. Übereinstimmend wurde auch im Rahmen dieser Arbeit keine Kolo-kalisation von CD1a und DC-LAMP beobachtet (nicht gezeigte Daten). Eine Infiltration von DC-LAMP⁺ reifen DC in Granulomen, wie sie für Sarkoidose beschrieben wurde [406], konnte weder in Lymphknoten des Stadiums drei von MW-Patienten noch bei Sarkoidose-Patienten beobachtet werden (Abb. 3.15 und nicht gezeigte Daten). Da DC-LAMP ein lysosomales Glykoprotein ist [64], zeigte die intrazelluläre Färbung sowohl im Gewebe (Abb. 3.15) als auch in Mo-DC (Abb. 3.9), statt der typischen DC-Morphologie, ein perinukleäres punktförmiges Expressionsmuster in der Zelle.

Aufgrund der Lokalisation von S-100⁺, CD1a⁺ und DC-LAMP⁺ DC in cortikalen und paracortikalen T-Zell-Arealen (Tab. 3.1, Abb. 3.15), handelt es sich bei diesen Populationen um reife DC, die in engem Kontakt mit naiven T-Zellen stehen [439] und an der Induktion zellulärer Immunantworten beteiligt sind. Akute Infektionen und entzündliche Prozesse sind mit einer verstärkten Einwanderung reifer DC in die Lymphknoten verbunden [63, 57, 440]. Eine Zunahme der S-100⁺ DC-Population konnte beispielsweise für entzündete Tonsillen [440] und mesenteriale Lymphknoten von Morbus Crohn-Patienten gezeigt werden [57]. Im Verlauf einer akuten Infektion durch Epstein-Barr-Viren (EBV) oder HIV wurde eine verstärkte Einwanderung von DC-SIGN⁺, S-100⁺ und CD1a⁺ DC in die Lymphknoten beobachtet, die von einer Hochregulierung von CD86, CD80 und CD40 begleitet wurde [63]. Dagegen wurde bei chronischen Infektionen, wie dem *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS)-Stadium der HIV-Infektion, kein Anstieg der DC-Population, aber eine verringerte Expression kostimulatorischer Moleküle im Lymphknoten nachgewiesen [63]. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Lymphknoten von Tuberkulose- und Sarkoidose-Patienten im fortgeschrittenen Stadium zeigten eine drastische Reduktion aller DC-Populationen (Abb. 3.16). Im Gegensatz dazu war die jeweilige Anzahl an DC-SIGN⁺, S-100⁺, CD1a⁺ und DC-LAMP⁺ DC in Lymphknoten von MW-Patienten im Vergleich zu normalen Lymphknoten tendenziell, jedoch nicht signifikant, reduziert (Abb. 3.16).

Die Quantifizierung der DC-Populationen in Lymphknoten wurde dadurch eingeschränkt, dass „normale“ Kontroll-Lymphknoten zwar histologisch einen unauffälligen Befund zeigten, aber entweder aufgrund einer Vergrößerung entnommen wurden (periphere Lymphknoten) oder aus der Umgebung eines Kolonkarzinoms stammten (mesenterialen Lymphknoten) und folglich eine gewisse Immunaktivierung aufwiesen. Damit ist zu erklären, dass sich Lymphknoten von MW-Patienten im

Stadium I bei der Quantifizierung von Zellpopulationen nicht von „normalen“ Lymphknoten unterschieden, obwohl sie durch eine leicht gesteigerte Proliferation und eine starke Präsenz verschiedener DC-Populationen gekennzeichnet waren (Abb. 3.16). Lymphknoten der MW-Patienten im Stadium III und insbesondere im Stadium II zeigten hingegen eine verringerte Anzahl S-100⁺, CD1a⁺ und DC-LAMP⁺ reifer interdigitierender DC sowie ein reduziertes Netzwerk aus DC-SIGN⁺ Zellen (Abb. 3.16), einhergehend mit der Zerstörung der Lymphknoten-Architektur.

Das Ausmaß der Proliferation war in Lymphknoten von MW-Patienten im Vergleich zu normalen Lymphknoten signifikant reduziert (Abb. 3.16) und deutet auf eine verringerte Aktivierung von B- und T-Lymphozyten hin. Wie bereits erwähnt, scheint der massive Befall durch *T. whipplei* zur Zerstörung der Keimzentren zu führen. Auch die Reduktion der DC-Population in Lymphknoten von MW-Patienten (Abb. 3.16) könnte zu einem Mangel an Aktivierungssignalen für die Proliferation von Lymphozyten führen. Darauf verweist die positive Korrelation von DC-SIGN⁺, S-100⁺ oder CD1a⁺ DC mit dem Grad der Proliferation in Lymphknoten von MW-Patienten (Abb. 4.2).

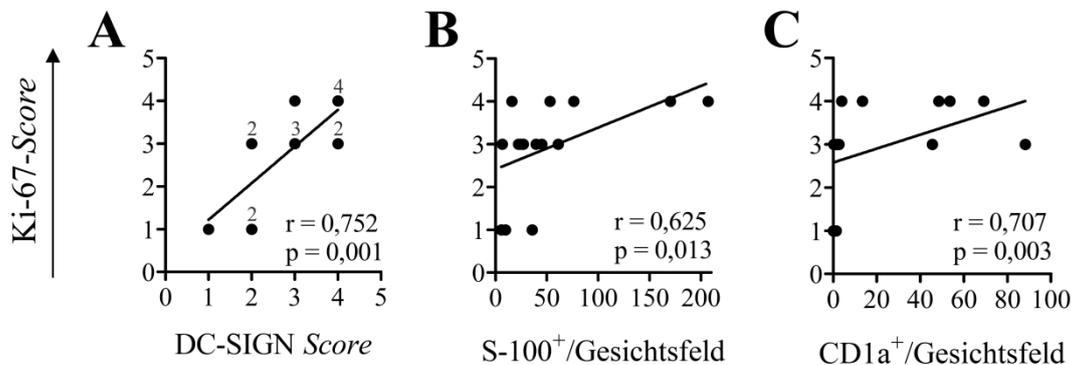


Abb. 4.2: Zusammenhang zwischen verschiedenen DC-Populationen und der Proliferation in Lymphknoten von MW-Patienten

In Lymphknoten-Präparaten un behandelter MW-Patienten wurde die Anzahl von S-100⁺ (B) und CD1a⁺ (C) Zellen pro Gesichtsfeld sowie der jeweilige Score (Erklärung siehe Abb. 3.16) von DC-SIGN (A) und Ki-67 (A-C) immunhistochemisch bestimmt. Die Korrelationsanalyse nach Spearman ergab jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$) zwischen der DC-SIGN⁺ (A), S-100⁺ (B) oder der CD1a⁺ (C) DC-Population und dem Ausmaß der Proliferation (Ki-67-Score) im Lymphknoten. Eingezeichnet sind die Regressionsgerade, der Korrelationskoeffizient r sowie der p -Wert. A: Die Nummern geben die Anzahl übereinanderliegender Datenpunkte an.

In DC-SIGN⁺ Zellen und seltener in S-100⁺, CD1a⁺ und DC-LAMP⁺ interdigitierenden DC waren einzelne *T. whipplei*-Bakterien erkennbar. Vorstellbar ist, dass *T. whipplei* über infizierte DC in die Lymphknoten gelangt [441]. Entsprechend wurden in peripheren Lymphknoten einiger MW-Patienten lediglich vereinzelte *T. whipplei*-Bakterien gefunden, statt vergrößerter Makrophagen mit PAS-positivem Material [434, 442]. Im Mausmodell für Tuberkulose wurde gezeigt, dass *Mycobacterium tuberculosis* bevorzugt myeloide DC in der Lunge befällt und über diese in die Lymphknoten gelangt [432]. Ebenso wurden bei der chronischen Infektion durch *Helicobacter pylori* nicht nur in Makrophagen, sondern auch in DC der paracortikalen Bereiche von Lymphknoten einzelne Bakterien nachgewiesen [431].

4.4 Funktionalität dendritischer Zellen in Morbus Whipple-Patienten

Zu den entscheidenden Funktionen der DC gehören die Erkennung von Pathogenen über PRR, die Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen, die Expression kostimulatorischer Liganden sowie die Produktion entzündlicher Zytokine [24]. Nur wenn DC diese Eigenschaften vereinen, sind sie in der Lage, effiziente Immunantworten gegen Pathogene zu induzieren [160].

Antwortfähigkeit der M-DC auf TLR4-Stimulation *ex vivo*

Zirkulierende M-DC im Blut von MW-Patienten zeigten eine normale TLR4-Expression (Abb. 3.5) und waren generell in der Lage, in Reaktion auf die Stimulation mit dem TLR4-Liganden LPS auszureifen (Abb. 3.3). Allerdings fiel die LPS-induzierte Hochregulierung der kostimulatorischen Moleküle CD83 und CD86 in M-DC von MW-Patienten, unabhängig vom Therapiestatus, schwächer aus als in M-DC von Kontrollpersonen (Abb. 3.3). Während sich die Anteile IL-10 und IL-23p19 exprimierender M-DC nicht zwischen den Untersuchungsgruppen unterschieden, war der Anteil der M-DC, die nach der TLR4-Stimulation IL-12 exprimierten, im Blut von MW-Patienten um ein Vierfaches geringer als bei Kontrollpersonen (Abb. 3.4). Dieses Ergebnis ergänzt die bereits veröffentlichten Arbeiten der Gruppe um T. Marth, welche für MW-Patienten eine reduzierte IL-12p40-Konzentration im Serum [353] und eine verringerte IL-12-Produktion in stimulierten Blut-Monozyten zeigen [355, 354]. Auch für Tuberkulose-Patienten wurde eine verminderte IL-12-Produktion der M-DC im Blut beschrieben, welche jedoch, im Gegensatz zu MW-Patienten, nach der Therapie wieder das Niveau von Gesunden erreichte [407].

Die moderate Expression kostimulatorischer Moleküle, die Hochregulierung von CCR7 und die nahezu fehlende IL-12-Produktion deuten darauf hin, dass der TLR4-Stimulus die M-DC bei MW-Patienten lediglich in einen semi-reifen Zustand versetzt [443]. Semi-reife M-DC besitzen zwar das Potenzial zur CCR7-vermittelten Einwanderung in lymphatische Organe, induzieren dort aber aufgrund des Fehlens von IL-12 und der Präsenz von IL-10 eine Polarisierung der naiven T-Zellen in Richtung T_{reg} [443] und/oder Th2 [166].

Da die M-DC direkt im Vollblut stimuliert wurden, könnten regulatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β , die in MW-Patienten unabhängig vom Behandlungsstatus systemisch erhöht sind [338, 352], für die verminderte IL-12-Produktion der M-DC verantwortlich sein. Für IL-10 und TGF- β ist jeweils beschrieben, dass sie die IL-12-Expression der Antigen präsentierenden Zellen inhibieren [444, 138]. Jedoch bewirkte die Vorinkubation mit neutralisierenden Antikörpern gegen TGF- β und IL-10 keine Veränderung der LPS-induzierten IL-12-Produktion der M-DC von MW-Patienten (Abb. 3.5). Auch durch die Erhöhung der jeweiligen Konzentration der Antikörper gegen IL-10 und TGF- β änderte sich die IL-12-Expression in M-DC von MW-Patienten nicht (Daten nicht gezeigt). In M-DC von Kontrollpersonen verstärkte die Blockade von IL-10 hingegen die IL-12-Expression (Abb. 3.5).

So scheinen TGF- β und IL-10 in MW-Patienten eher die Polarisierung der T-Zellen zu beeinflussen, anstatt die IL-12-Produktion der DC direkt zu blockieren [445, 224].

Für die Expression großer Mengen IL-12 in Reaktion auf ein TLR-Signal benötigen DC zusätzlich IFN- γ [142, 144]. Durch die Zugabe von IFN- γ zum LPS-Stimulus gelang es, den Anteil IL-12 produzierender M-DC im Blut von MW-Patienten auf das Niveau der Kontrollpersonen anzuheben (Abb. 3.5). Folglich scheint die reduzierte Reaktion der M-DC von MW-Patienten auf den TLR4-Stimulus LPS teilweise der reduzierten IFN- γ -Konzentration im Blut [352] geschuldet zu sein. Entsprechend wurde auch eine erfolgreiche Behandlung rezidivierender *T. whipplei*-Infektionen mit rekombinantem IFN- γ beschrieben [361].

Die IL-12-Produktion der DC in Reaktion auf mikrobielle und inflammatorische Stimuli erfolgt in einem begrenzten Zeitfenster [99]. Anhaltende mikrobielle Reize führen zu einer irreversiblen Erschöpfung der ausgereiften DC [136], welche auch nicht durch die Zugabe von IFN- γ aufgehoben werden kann, da reife DC den IFN- γ -Rezeptor herunterregulieren [173]. Die M-DC im Blut von MW-Patienten zeigten jedoch ohne Stimulation einen unreifen Phänotyp und reagierten auf die Zugabe von IFN- γ zum LPS-Stimulus mit einer Verstärkung der IL-12-Produktion (Abb. 3.5). Deshalb ist eine Verringerung der IL-12-Produktion infolge einer Erschöpfung zirkulierender reifer M-DC durch permanente Reize bei MW-Patienten unwahrscheinlich.

Personen mit einem genetischen Defekt innerhalb des IL-12/IL-23/IFN- γ -Signalwegs weisen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber mykobakteriellen Infektionen auf [446]. So scheint die permanent und systemisch reduzierte Konzentration von IL-12 [353] und IFN- γ [352] in MW-Patienten für eine Persistenz von *T. whipplei* zu prädisponieren.

Interessanterweise zeigten M-DC von MW-Patienten nach der Behandlung einen signifikanten Anstieg der Expression von IL-23p19, während die Expression von IL-12 weiterhin im Vergleich zu Kontrollpersonen erniedrigt blieb (Abb. 3.4). Eine kompensatorische Funktion von IL-23 bei Abwesenheit von IL-12 wurde für Infektionen durch *Mycobacterium tuberculosis* oder *Toxoplasma gondii* im Mausmodell beschrieben [447, 448]. Dabei induzierte IL-23 schwache Antigen-spezifische Th1- und Th17-Antworten, die trotz Fehlen des Th1-polarisierenden Zytokins IL-12 einen gewissen Schutz vermittelten [447].

Mo-DC als Modell für die Funktionalität interstitieller und interdigitierender DC

Monozyten können sich *in vivo* und *in vitro* unter dem Einfluss mikrobieller oder inflammatorischer Stimuli zu DC entwickeln [80, 426, 74, 449]. Daher sind Mo-DC ein geeignetes Modell, um die Funktionalität von DC myeloiden Ursprungs und deren Modulation durch ausgewählte Faktoren *in vitro* zu untersuchen. In ihren Eigenschaften ähneln unreife Mo-DC den interstitiellen DC in nicht-lymphatischen Geweben und im reifen Zustand den interdigitierenden DC in der T-Zellzone der Lymphknoten [80, 384].

In vitro generierte Mo-DC und frisch aus dem Blut isolierte M-DC haben morphologisch, phänotypisch und funktionell viele Gemeinsamkeiten, wie die Expression von TLR, die Ausreifung in Reaktion auf inflammatorische Stimuli, die CCR7/CCL21-vermittelte Migration und das T-Zell-stimulatorische Potenzial [46]. Wesentliche Unterschiede zwischen Mo-DC und M-DC bestehen allerdings darin, dass M-DC schneller und stärker spontan oder durch inflammatorische Stimuli ausreifen, während Mo-DC nach der Aktivierung wesentlich höhere Mengen inflammatorischer Zytokine produzieren und potentere Th1-Antworten induzieren [46].

Anders als die M-DC im Vollblut, die unter dem Einfluss des Zytokinmilieus bei MW-Patienten eine verringerte Reifung in Reaktion auf LPS zeigten, unterschieden sich die unter Standard-Zytokinbedingungen generierten Mo-DC der MW-Patienten phänotypisch nicht von denen der Kontrollpersonen - sowohl im unreifen Zustand, als auch nach der Ausreifung durch TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂. Nahezu 80 % der unreifen Mo-DC exprimierten den Pathogen-Erkennungsrezeptor DC-SIGN (Abb. 3.6), der Mo-DC *in vivo* [384, 421] und *in vitro* [58] kennzeichnet. Die Expression von HLA-DR, CD1a und kostimulatorischen Molekülen (CD40, CD80, CD86, CD83, PD-L1) (Abb. 3.6 und nicht gezeigte Daten) und die Fähigkeit, CMV-spezifische Th1-Antworten zu induzieren (Abb. 3.10), zeugen von der stimulatorischen Kapazität der *in vitro* ausgereiften Mo-DC von MW-Patienten. Daneben deuten die fehlende Expression von CCR6 und die hohe Expression von CCR7 der Mo-DC auf die Fähigkeit zur Einwanderung in lymphatische Gewebe hin [46, 109].

Unreife Mo-DC von MW-Patienten und Kontrollpersonen zeigten gleichermaßen eine schwache Expression von Fc γ -Rezeptoren und eine starke Expression der Komplementrezeptor-Untereinheiten CD11b (CR3A) (Abb. 3.6) und CD11c (CR4A) (nicht gezeigte Daten), welche die Phagozytose stimulieren [5]. Marth und Kollegen beschrieben eine reduzierte Anzahl CD11b⁺ mononukleärer Zellen im Blut von MW-Patienten [346] und postulierten, dass die verringerte Expression von CD11b für die verringerte Fähigkeit der mononukleären Phagozyten zur Eliminierung von *T. whipplei* [345, 338] verantwortlich sein könnte. Diese Beobachtung bestätigte sich in dieser Arbeit jedoch nicht, da unreife Mo-DC eine normale Expression von CD11b zeigten (Abb. 3.6) und die Fähigkeit zur Endozytose von Dextran-Partikeln (Abb. 3.8) und lebenden *T. whipplei* besaßen (Abb. 3.9).

Die Expression des lysosomalen Glykoproteins DC-LAMP [64] war in Mo-DC von MW-Patienten und Kontrollpersonen gering (Abb. 3.6) und trat perinukleär konzentriert auf (Abb. 3.9), wie es auch bei reifen DC in den Lymphknoten beobachtet wurde (Abb. 3.15). Allerdings zeigten unreife und reife Mo-DC von MW-Patienten eine verringerte DC-LAMP-Expression im Vergleich zu Mo-DC von Kontrollpersonen (Abb. 3.6), was zu einer reduzierten oder verzögerten Prozessierung von *T. whipplei* in lysosomalen Kompartimenten führen könnte.

Reife Mo-DC von MW-Patienten waren in der Lage, eine spezifische CD4⁺ T-Zellantwort gegen CMV-Antigene zu stimulieren, induzierten aber nach der Stimulation mit *T. whipplei*-Lysat, im Gegensatz zu Mo-DC von Kontrollpersonen, keine oder lediglich eine schwache Proliferation und IFN- γ -Produktion *T. whipplei*-spezifischer CD4⁺ T-Zellen (Abb. 3.10). Die verminderte Aktivierung

einer *T. whipplei*-spezifischen Th1-Antwort durch Mo-DC von MW-Patienten könnte auf einen Defekt in der Präsentation immundominanter *T. whipplei*-Antigenpeptide zurückzuführen sein. Darauf deutet die Assoziation der HLA-Allele DRB1*13 und DQB1*06 mit der chronischen Manifestation der *T. whipplei*-Infektion hin [307]. Auch bei anderen Infektionskrankheiten wie Lepra und Tuberkulose ist eine fehlende oder veränderte T-Zell-vermittelte Immunität gegen den Erreger mit bestimmten HLA-Typen assoziiert [450, 451, 452]. Als weitere Ursachen für die fehlende *T. whipplei*-spezifische T-Zellantwort sind ein Defekt im T-Zell-Rezeptor-Repertoire [453, 454] oder eine Depletion der *T. whipplei*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen [271, 269] infolge der persistierenden hohen Konzentration des Antigens denkbar.

Die veränderte Zytokinproduktion der unter pro-inflammatorischen Bedingungen generierten Mo-DC von MW-Patienten liefert einen Hinweis auf einen intrinsischen Defekt der myeloiden Zellen. Die Mo-DC von MW-Patienten zeigten zwar eine normale Produktion von IL-12p40 und IL-23, sekretierten aber unabhängig vom Reifungszustand geringere Mengen an IL-12p70 als Mo-DC von Kontrollpersonen (Abb. 3.7). Zudem steigerte die Zytokin-induzierte Ausreifung nur bei Mo-DC von MW-Patienten die Sekretion von IL-10 (Abb. 3.7).

Die insgesamt niedrige Produktion von IL-12p70 könnte auf die zur Aktivierung und Ausreifung der Mo-DC verwendeten pro-inflammatorischen Zytokine zurückzuführen sein. Es ist beschrieben, dass PGE₂, TNF- α , IL-1 β oder IL-6 die IL-12p70-Produktion in DC verringern [105, 443]. Die Zytokin-vermittelte Ausreifung wurde in dieser Arbeit dennoch favorisiert, da sie das inflammatorische Zytokinmilieu im Gewebe nachahmt [455, 456]. Zudem ist insbesondere PGE₂ notwendig, um eine optimale Reifung zu erreichen und die Vitalität der Mo-DC in Kultur aufrecht zu erhalten [104, 457].

Das angewendete verkürzte Protokoll zur Generierung der Mo-DC innerhalb von 48 Stunden (statt sieben bis neun Tagen) erlaubte es, Reifung, Endozytosekapazität, Zytokinproduktion und T-Zell-stimulatorische Kapazität möglichst nah an der physiologischen Situation zu untersuchen [369]. Denn im Gegensatz zu Makrophagen besitzen DC *in vivo* eine kurze Lebensdauer [52] und reifen in Reaktion auf Aktivierungssignale innerhalb weniger Stunden aus [99].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL-16, das in unbehandelten MW-Patienten systemisch erhöht vorkommt [349], keinen direkten Einfluss auf Differenzierung, Reifung, Endozytose-Kapazität, Zytokin-Produktion und Fähigkeit zur T-Zellstimulation der Mo-DC *in vitro* hat (Abb. 3.11). Della Bella und Kollegen beschrieben, dass IL-16 zwar nicht allein, aber in Kombination mit Thrombopoetin eine tolerisierende Wirkung auf DC ausübt [458]. Inwiefern die erhöhte Thrombozytenzahl bei MW-Patienten (nicht veröffentlichte Daten unserer Gruppe) mit einem Anstieg des Thrombopoetin-Spiegels assoziiert ist, der zusammen mit der erhöhten Serumkonzentration von IL-16 [349] zu einer Tolerisierung der DC führen könnte, bleibt zu klären. Statt eine direkte Wirkung auf DC auszuüben, könnte IL-16 in MW-Patienten auch Immunzellen in die peripheren Lymphknoten rekrutieren und so granulomatöse Entzündungsreaktionen (Tab. 3.2)

fördern [347]. In Phagozyten, insbesondere in Makrophagen, begünstigt IL-16 das intrazelluläre Überleben und die Replikation von *T. whipplei* [343]. Darüber hinaus könnte IL-16 in hoher Konzentration auch zur beobachteten Anergie der CD4⁺ Effektor-T-Zellen (Abb. 3.25, Abb. 3.26) beitragen [459] oder die Generierung und Aktivierung von T_{reg} (Abb. 3.22) fördern [460].

Die Ergebnisse zeigen, dass DC myeloiden Ursprungs in MW-Patienten einen intrinsischen Defekt in ihrer Fähigkeit zur IL-12-Produktion besitzen und dass *T. whipplei*-spezifische CD4⁺ T-Zellantworten bei MW-Patienten auch nicht *in vitro* unter standardisierten pro-inflammatorischen Zytokin-Bedingungen generiert werden können. Das regulatorische Zytokinmilieu im Blut scheint zudem dazu beizutragen, die Antwortfähigkeit der DC auf Pathogen-Signale herabzusetzen.

4.5 Beeinflussung dendritischer Zellen durch *Tropheryma whipplei*

Humanpathogene intrazelluläre Bakterien sind in der Lage, mit Hilfe verschiedener Immun-Escape-Mechanismen der Abwehr des Immunsystems zu entgehen [6, 283, 284]. Auch *T. whipplei* sichert sein intrazelluläres Überleben durch die Modulation der Makrophagen-Funktion [343, 342, 341]. In dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss von *T. whipplei* auf die Funktion der DC untersucht.

In M-DC und Mo-DC induzierten inaktivierte *T. whipplei* zwar eine schwache phänotypische Reifung (Abb. 3.3, Abb. 3.8). Allerdings war die induzierte Zunahme der Oberflächenexpression von CD83 und CD86 in M-DC geringer als nach der Stimulation mit LPS und in Mo-DC geringer als nach der Ausreifung durch pro-inflammatorische Zytokine. Im Gegensatz zu dem bakteriellen TLR4-Liganden LPS induzierte *T. whipplei*-Lysat in M-DC keine Hochregulation von CCR7 (Abb. 3.3). Vermutlich sind *in vivo* noch andere Stimuli wie die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α erforderlich, um in MW-Patienten nach dem Kontakt mit *T. whipplei* die Einwanderung der DC in die lymphatischen Organe zu ermöglichen. Zudem induzierte *T. whipplei* in M-DC nicht die Expression der Zytokine IL-12 und IL-23 (Abb. 3.4). Folglich ist *T. whipplei* ein schwacher Aktivierungsstimulus für DC. Eine vollständige Ausreifung der DC erfordert daher zusätzliche Signale, etwa durch IFN- γ [144], das von Zellen der angeborenen Abwehr sekretiert wird oder die Interaktion mit T-Zellen über CD40/CD40-Ligand [126, 461].

In Mo-DC von Kontrollpersonen, aber nicht von MW-Patienten, verstärkte die Zugabe von *T. whipplei*-Lysat die Zytokin-induzierte Reifung, insbesondere die Hochregulierung der kostimulatorischen Moleküle CD83 und CD86 (Abb. 3.6). Unterschiedliche Reaktionen der Mo-DC von MW-Patienten und Kontrollpersonen gegenüber *T. whipplei* waren auch hinsichtlich der Zytokinproduktion erkennbar. Die Stimulation mit *T. whipplei*-Lysat zum Zeitpunkt der Ausreifung verringerte bei Mo-DC von MW-Patienten die Sekretion von IL-12p40 und erhöhte bei Mo-DC von Kontrollpersonen die Produktion von IL-23 (Abb. 3.7). Die Sekretion von IL-10 wurde hingegen in Mo-DC von MW-Patienten und Kontrollpersonen durch die Zugabe von *T. whipplei*-Lysat

gleichermaßen verstärkt (Abb. 3.7). Eine Modulation der Reifung und Zytokinexpression in DC wurde auch für andere intrazelluläre Pathogene beschrieben und fördert deren Überleben im Wirt [462, 170]. So löst die Stimulation von Mo-DC mit *Mycobacterium tuberculosis* allein bereits eine schwache Produktion von IL-23 und IL-10 aus, erfordert jedoch IFN- γ zur Induktion von IL-12 [170]. *Bordetella pertussis* induziert in DC die Produktion von IL-10 und fördert so die Generierung von Tr1 [284]. Mit *Bartonella henselae* infizierte Mo-DC reifen zwar aus, zeigen aber eine verstärkte IL-10- und eine verringerte IL-12-Produktion im Vergleich zur Stimulation mit LPS [463]. Dagegen reifen mit HIV infizierte DC nicht aus, produzieren kein IL-12p70 und supprimieren T-Zellantworten [462, 464].

Die Mo-DC von MW-Patienten besitzen also nicht nur einen intrinsischen Defekt in der IL-12-Produktion, sondern reagieren auch anders auf den *T. whipplei*-Stimulus als Mo-DC von gesunden Kontrollpersonen (Abb. 3.7). Dies könnte auf Unterschiede im Pathogen-Erkennungsrezeptor-Profil und damit in der Erfassung von *T. whipplei*-Strukturen und der Verarbeitung der Signale zurückzuführen sein. Welche Rezeptoren an der Erkennung von *T. whipplei* beteiligt sind, ist bislang weitestgehend unbekannt. Die Arbeitsgruppe um B. Desnues beschrieb eine erhöhte Expression von TLR2 in mit *T. whipplei* infizierten murinen Makrophagen [342] und der duodenalen Mukosa eines unbehandelten MW-Patienten [341] und lieferte damit einen Hinweis für die Beteiligung von TLR2 an der Pathogenese des MW. Auch M-DC im Blut von unbehandelten MW-Patienten zeigten eine verstärkte Expression von TLR2 (unveröffentlichte Daten unserer Gruppe). Über TLR2 werden Zellwandbestandteile grampositiver Bakterien wie Lipoteichonsäure, Lipoproteine und Peptidoglykan erkannt [96]. Die Bindung an TLR2 induziert in DC die Freisetzung von IL-23 und IL-10, inhibiert jedoch die Produktion von IL-12 und begünstigt so Th2-Antworten [97, 465, 170].

Entscheidend für die Pathogenität von *T. whipplei* ist die Glykosylierung seiner Oberflächenproteine [327]. Es ist vorstellbar, dass diese über den C-Typ-Lektin-Rezeptor DC-SIGN [58] erkannt werden, welcher u.a. Mannose-haltige Glykokonjugate von Pathogenen bindet [89] und TLR-Signale moduliert [466]. So induziert die Bindung von mannosyliertem Lipoarabinomannan von *Mycobacterium tuberculosis* an DC-SIGN in DC *in vitro* die Produktion von IL-10 und reduziert die LPS-induzierte Reifung [467]. Auch probiotische Bakterien modulieren die Funktion der DC über DC-SIGN und tragen so zur Generierung IL-10 produzierender T_{reg} bei [468].

Einzelne *T. whipplei*-Bakterien wurden *in vitro* von unreifen Mo-DC aufgenommen, waren aber auch im infizierten Gewebe in DC nachweisbar (Abb. 3.9, Abb. 3.13). In mit *T. whipplei* inkubierten Duodenalbiopsien gehörten DC-SIGN⁺ unreife DC unterhalb der Epithelschicht zu den ersten Zellen, die *T. whipplei* internalisierten (Abb. 3.13). Ob *T. whipplei* über unspezifische Phagozytose oder Rezeptor-vermittelt in die Wirtszelle gelangt, bleibt in zukünftigen Versuchen zu klären. Einige Pathogene wie HIV und Mykobakterien nutzen beispielsweise DC-SIGN zum Eintritt in die Wirtszelle [416, 89, 469]. In Mo-DC von MW-Patienten wurde allerdings nach 30 min Inkubation mit lebenden *T. whipplei* keine Kolokalisation von DC-SIGN und *T. whipplei* beobachtet (Abb. 3.9).

Ein Teil der Mo-DC, die lebende *T. whipplei* aufgenommen hatten, exprimierten das lysosomale Glykoprotein DC-LAMP (Abb. 3.9), welches reife DC kennzeichnet [64]. Zwar ist denkbar, dass ein geringer Anteil der Mo-DC spontan in Kultur ausreift, jedoch war bezeichnend, dass nahezu alle reifen (DC-LAMP⁺) Mo-DC intrazelluläre *T. whipplei*-Bakterien enthielten (Abb. 3.9), was auf eine *T. whipplei*-induzierte Reifung der DC hinweist. Innerhalb der Mo-DC kolokalisierte *T. whipplei* teilweise mit DC-LAMP oder HLA-DR (Abb. 3.9), was für einen Transport der Bakterien in Kompartimente spricht, in denen die Beladung der MHC-Komplexe mit Antigenpeptiden stattfindet [64, 470].

Im Gegensatz zu Makrophagen enthielten die DC im Gewebe nur einzelne intrazelluläre *T. whipplei*-Bakterien (Abb. 3.13, Abb. 3.14, Abb. 3.15). Das könnte daran liegen, dass *T. whipplei* für seine intrazelluläre Replikation ein saures Milieu benötigt [350]. Anders als Makrophagen besitzen die Phagosomen der DC einen nahezu alkalischen pH-Wert, der die Prozessierung von Antigenen begünstigt [93]. Für *Mycobacterium tuberculosis* wurde beschrieben, dass es in DC überlebt, aber nicht replizieren kann, da ihm in Phagosomen von DC der Zugang zu essentiellen Nährstoffen verwehrt bleibt [471]. Infizierte DC scheinen nicht in der Lage zu sein, den Erreger zu eliminieren und könnten daher ein Reservoir für dessen Persistenz und Ausbreitung bilden [471, 472]. Ein geringer Anteil der DC könnte aus dem Gewebe über die Lymphknoten und efferenten Lymphe in die Blutbahn gelangen [413, 112] und so, neben Monozyten [340], zur Verteilung von *T. whipplei* auf periphere Gewebe beitragen.

Über die Modulation der Zytokinproduktion in Makrophagen könnte *T. whipplei* auch indirekt die Funktion der interstitiellen DC beeinflussen. Beispielsweise sekretieren mit *T. whipplei* infizierte Makrophagen IFN-Typ I [342], welches die Reifung und stimulatorische Fähigkeit von Mo-DC beeinträchtigt [473]. Die DC könnten aber auch Fragmente von Zellen aufnehmen, die durch die Infektion mit *T. whipplei* apoptotisch geworden sind, diese im Lymphknoten entweder direkt präsentieren oder auf andere DC transferieren und so Toleranz induzieren [252, 474].

4.6 Veränderung der CD4⁺ T-Zellpopulation in Morbus Whipple-Patienten

Verschiedene Infektionen durch Viren (EBV, CMV), Bakterien (Tuberkulose), Parasiten oder Pilze sind durch systemisch reduzierte CD4⁺-T-Zellzahlen gekennzeichnet, welche sich meist nach der Beseitigung des Erregers normalisieren [475]. Auch bei MW-Patienten war die Anzahl der CD4⁺ T-Lymphozyten sowohl in der Blutzirkulation als auch in der duodenalen Mukosa vor Therapiebeginn verringert (Abb. 3.17, Abb. 3.19). Es konnte gezeigt werden, dass die in MW-Patienten beobachtete Verringerung der CD4/CD8 Ratio [387, 346] nicht auf eine Zunahme der CD8⁺ T-Lymphozytenzahl, sondern vielmehr auf die selektive Reduktion der CD4⁺-Population zurückzuführen ist (Abb. 3.17). Bei Patienten mit einer akuten Norovirus-Infektion war ebenfalls eine Abnahme der Anzahl an CD4⁺ T-Zellen im Blut zu verzeichnen, welche allerdings aus der verstärkten Einwanderung der

CD4⁺ T-Zellen in den Darm resultierte [399]. Dagegen zeigten MW-Patienten unabhängig vom Therapiestatus einen reduzierten Anteil an CD4⁺ T-Lymphozyten, die das Darm-*Homing*-Molekül Integrin β_7 [389, 388] exprimierten, und eine deutlich verringerte Anzahl an CD4⁺ T-Zellen im Duodenum im Vergleich zu Kontrollpersonen (Abb. 3.19).

Die systemisch reduzierte Anzahl und der verringerte Darmtropismus der CD4⁺ T-Zellen in MW-Patienten könnten auf eine gestörte Aktivierung und Prägung von naiven CD4⁺ T-Zellen durch DC in den Lymphknoten zurückzuführen sein [154]. Es ist denkbar, dass eine schwache Stimulation durch nicht vollständig ausgereifte DC und das Fehlen polarisierender IL-12-Signale die Differenzierung und das Überleben der CD4⁺ T-Zellen beeinträchtigen [136, 255]. Entsprechend zeigten MW-Patienten initial eine verringerte Anzahl an CD4⁺ T_{EM} und einen erhöhten Anteil aktivierter, aber für Suppression anfälligerer Zellen innerhalb der CD4⁺ Population im Blut (Abb. 3.18, Abb. 3.25). Zudem war die Anzahl an CD31⁺ naiven CD4⁺ T-Zellen, die RTE enthalten [199], im Blut von MW-Patienten sowohl vor als auch nach der Behandlung im Vergleich zu Gesunden mit gleicher Altersverteilung reduziert (Abb. 3.18), was auf eine permanent verminderte Thymusleistung bei MW-Patienten hindeutet [194]. Eine intakte Thymusfunktion ist jedoch gerade bei chronischen Infektionen essenziell, um den zur Eliminierung des Erregers erforderlichen Nachschub an T-Zellen bereitzustellen [198]. Während in Gesunden die altersbedingte Abnahme der Thymusfunktion (und damit der RTE-Zahl) durch eine verstärkte Proliferation der zentral-naiven T-Zellen in der Peripherie ausgeglichen wird [200, 198], zeigten MW-Patienten keine kompensierende Zunahme der CD31⁺ zentral-naiven CD4⁺ T-Zellpopulation (Abb. 3.18). In unbehandelten MW-Patienten tragen somit die transiente Abnahme der T_{EM}-Population infolge der chronischen Infektion und der verminderte Nachschub naiver T-Zellen wesentlich zur systemischen Verringerung der CD4⁺ T-Lymphozyten-Population bei. Die Abtötung von *T. whipplei* infolge der Antibiotika-Behandlung scheint in den MW-Patienten die Aktivierung naiver T-Zellen und deren Proliferation und Differenzierung in Effektor-/Gedächtniszellen zu fördern. Durch die Zunahme der T_{EM}-Population nähert sich die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen im Blut von behandelten MW-Patienten dem Normalniveau an (Abb. 3.18). Dagegen scheint die reduzierte Thymusfunktion in MW-Patienten bestehen zu bleiben, was jedoch in zukünftigen Arbeiten durch die Bestimmung der Teilungsaktivität der naiven CD4⁺ T-Zellsubpopulation über deren TREC (*T cell excision circles*)-Gehalt und Ki-67-Expression überprüft werden müsste [196].

4.7 T-Zellregulation und Anergie

Regulatorische T-Zellen

Bei chronischen Infektionen spielen T_{reg} im Darm [476, 399, 400], in den Lymphknoten [477] und in der Peripherie [478, 479] eine wichtige Rolle bei der Regulation entzündlicher Prozesse. Einerseits verhindern T_{reg} exzessive Immunreaktionen und schützen so das Gewebe vor Zerstörung [479, 398, 400]. Andererseits kann ein Überschuss an T_{reg} auch die zur Eliminierung des Pathogens erforderliche Immunaktivierung inhibieren und so zur Persistenz der Infektion beitragen [480, 481, 482].

Initial zeigten MW-Patienten eine erhöhte Anzahl an $FOXP3^+$ T_{reg} in der Lamina propria, dem Gewebe mit der höchsten Bakterienlast, im Vergleich zu Kontrollpersonen mit unauffälligem Befund (Abb. 3.21). Anders als bei einer akuten Norovirus-Infektion [399], war die Zunahme der T_{reg} im Duodenum der MW-Patienten keine Begleiterscheinung einer Infiltration von $CD4^+$ Lymphozyten (Abb. 3.21). Im Gegenteil: MW-Patienten zeigten sowohl vor als auch nach der Behandlung eine verringerte Anzahl $CD4^+$ und $CD45RO^+$ T-Lymphozyten in der duodenalen Mukosa (Abb. 3.19).

In den Lymphknoten unterschied sich die Anzahl der $FOXP3^+$ T_{reg} hingegen nicht signifikant zwischen MW-Patienten und den drei Kontrollgruppen (normal, Tuberkulose, Sarkoidose; Abb. 3.20). Dies könnte zum einen auf die Zerstörung der Lymphknoten-Architektur bei einigen MW-Patienten und die dadurch verringerte T-Zellaktivierung und -prägung durch DC zurückzuführen sein und zum anderen mit der kontinuierlichen Auswanderung der T_{reg} ins Gewebe begründet werden [23]. Entsprechend war die Proliferation in den Lymphknoten der MW-Patienten mit der Generierung von $FOXP3^+$ T_{reg} assoziiert (Abb. 4.3A) und eine Zunahme der $FOXP3^+$ T_{reg} im Duodenum hing von einem Anstieg der T_{reg} -Zahl in den mesenterialen Lymphknoten ab (Abb. 4.3B).

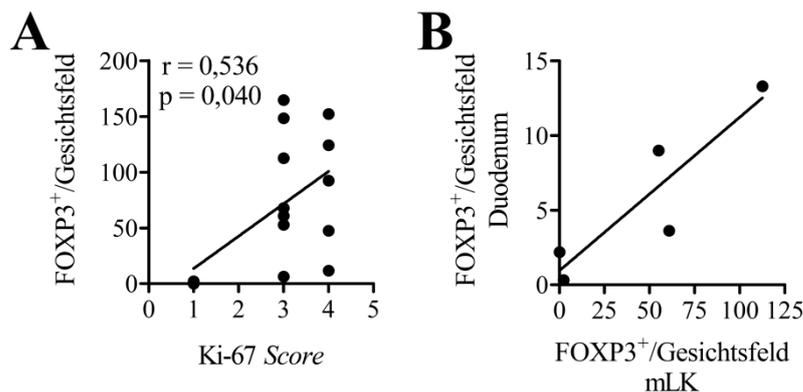


Abb. 4.3: Zusammenhang zwischen Proliferation und Generierung von T_{reg} im Lymphknoten und der Präsenz von T_{reg} im Duodenum von MW-Patienten

A: Zusammenhang zwischen der Proliferation (Ki-67 Score siehe Abb. 3.16) und der Anzahl $FOXP3^+$ Zellen in den Lymphknoten unbehandelter MW-Patienten. B: Beziehung zwischen der Anzahl $FOXP3^+$ Zellen in mesenterialen Lymphknoten (mLK) und der korrespondierenden Anzahl im Duodenum derselben unbehandelten MW-Patienten. Eingezeichnet sind jeweils die Regressionsgerade sowie in A: der mittels Korrelationsanalyse nach Spearman berechnete Korrelationskoeffizient r und der p -Wert ($p < 0,05$ signifikante Korrelation).

Im peripheren Blut von MW-Patienten war der Anteil der T_{reg} innerhalb der CD4⁺ T-Zellen zwar nicht erhöht, aber die gesteigerte Expression von CD39 und CTLA-4 auf der Oberfläche der zirkulierenden CD25^{high} T_{reg} (Abb. 3.22) deutet auf ein verstärktes regulatorisches Potenzial der T_{reg} in MW-Patienten hin [483, 247]. Dabei kompetiert CTLA-4 mit CD28 um die Bindung an CD80/CD86 auf Antigen präsentierenden Zellen und vermittelt inhibitorische Signale [483, 240]. Die Ektonukleotidase CD39 verhindert ATP-induzierte inflammatorische Effekte und ist für die Suppression der IL-17 Produktion erforderlich [247, 395, 248].

Entsprechend zeigten T_{reg} von MW-Patienten *in vitro* ein erhöhtes Potenzial zur Suppression der Aktivierung, IFN- γ - und IL-17-Produktion der CD4⁺ Effektorzellen im Vergleich zu T_{reg} von gesunden Kontrollpersonen (Abb. 3.23). Allerdings wurden hinsichtlich der Suppression der Proliferation von CD4⁺ Effektorzellen durch T_{reg} keine Unterschiede zwischen MW-Patienten und Kontrollpersonen beobachtet (nicht gezeigte Daten). Vermutlich war die Inkubationszeit von vier Tagen nicht optimal, um die Proliferation zu detektieren. Da die Produktion von IL-10 und IL-4 unter dem Einfluss der T_{reg} - im Gegensatz zu IFN- γ und IL-17 - nicht verändert war, scheinen die T_{reg} in MW-Patienten bevorzugt die Th1- und Th17-Polarisierung der CD4⁺ T-Zellen zu inhibieren. Hierbei könnten Zellkontakt-abhängige Vorgänge eine Rolle spielen [201], welche im Zusammenhang mit der erhöhten Expression von CTLA-4 und CD39 auf zirkulierenden T_{reg} von MW-Patienten stehen [393, 395]. Auch ein Einfluss der regulatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β ist möglich [224], wengleich Vorversuche unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben, dass CD4⁺ T-Zellen und T_{reg} in MW-Patienten keine erhöhte IL-10-Produktion aufweisen (nicht gezeigte Daten).

Die Depletion der T_{reg} beeinflusste weder in CD4⁺ T-Zellen von MW-Patienten noch von gesunden Kontrollpersonen die spezifische Th1-Reaktivität gegen *T. whipplei* (Abb. 3.24). Eine Antigen-spezifische Suppression, wie sie für chronische Infektionen mit HIV und *Helicobacter pylori* beschrieben wurde [480, 476], scheint bei MW-Patienten also nicht vorzuliegen. Der Grund könnte ein Defekt in der Präsentation oder Erkennung von *T. whipplei*-Antigenen sein. Dafür spricht, dass selbst in der Kokultur der unter Standard-Zytokinbedingungen generierten Mo-DC und autologen T-Zellen von MW-Patienten keine *T. whipplei*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen aktiviert wurden (Abb. 3.10) und dass die nahezu fehlende *T. whipplei*-spezifische Th1-Antwort bei MW-Patienten selbst nach der erfolgreichen Therapie bestehen blieb (Abb. 3.26). Daher scheinen die T_{reg} in MW-Patienten nicht direkt für die fehlende *T. whipplei*-spezifische Th1-Aktivität verantwortlich zu sein, könnten aber wesentlich zur Regulation inflammatorischer Prozesse beitragen. Bei MW-Patienten, die nach dem Therapiebeginn IRIS entwickeln [313], ist die T_{reg}-Zahl im Duodenum initial gering (V. Moos, Manuskript in Revision) und scheint nicht auszureichen, um die nach der Beseitigung von *T. whipplei* einsetzende Entzündungsreaktion zu kontrollieren.

Das systemisch und lokal vorherrschende regulatorische Zytokinmilieu in MW-Patienten [338, 352] könnte nicht nur die Reifung und Aktivierung der DC behindern, sondern auch die Induktion von T_{reg} begünstigen [485, 224]. Insbesondere TGF- β induziert in CD4⁺ T-Zellen die Expression von

FOXP3 [486] und die Hochregulation von CTLA-4 und CD25 [223]. Antigen präsentierende Zellen werden unter dem Einfluss von IL-10 und TGF- β tolerogen und induzieren T_{reg} [487, 488]. Eine mögliche Quelle für die regulatorischen Zytokine könnten Makrophagen in der duodenalen Lamina propria sein, in denen die Infektion mit *T. whipplei* einen alternativ aktivierten Phänotyp und die Expression von IL-10- und TGF- β -mRNA induziert [341]. Umgekehrt können auch T_{reg} eine alternative Makrophagen-Aktivierung induzieren [233], die für die Persistenz von *T. whipplei* entscheidend ist [338, 341]. Ferner sind T_{reg} in der Lage, DC in einen tolerogenen Zustand zu versetzen, indem sie über die Bindung von CTLA-4 an CD80/CD86 auf der Oberfläche der DC die Herunterregulierung dieser kostimulatorischen Moleküle veranlassen [240, 239].

Im Gegensatz zu natürlichen T_{reg}, die ihren Ursprung im Thymus haben, können sich induzierte T_{reg} in Geweben entwickeln [220]. Im GALT sind tolerogene DC, die TGF- β und Retinolsäure sekretieren [216, 84] und Makrophagen in der Lamina propria für die Induktion und Aufrechterhaltung der T_{reg}-Population verantwortlich [489, 490]. So könnten die T_{reg} im Duodenum von MW-Patienten durch den Kontakt mit alternativ aktivierten Makrophagen [491] oder semi-reifen bzw. tolerogenen DC in den mesenterialen Lymphknoten generiert worden sein [492, 493]. Für Letzteres spricht, dass die Zunahme der FOXP3⁺ T_{reg} in der duodenalen Mukosa von MW-Patienten mit der Präsenz von DC-SIGN⁺, S-100⁺, CD1a⁺ und DC-LAMP⁺ DC in mesenterialen Lymphknoten assoziiert ist (Abb. 4.4).

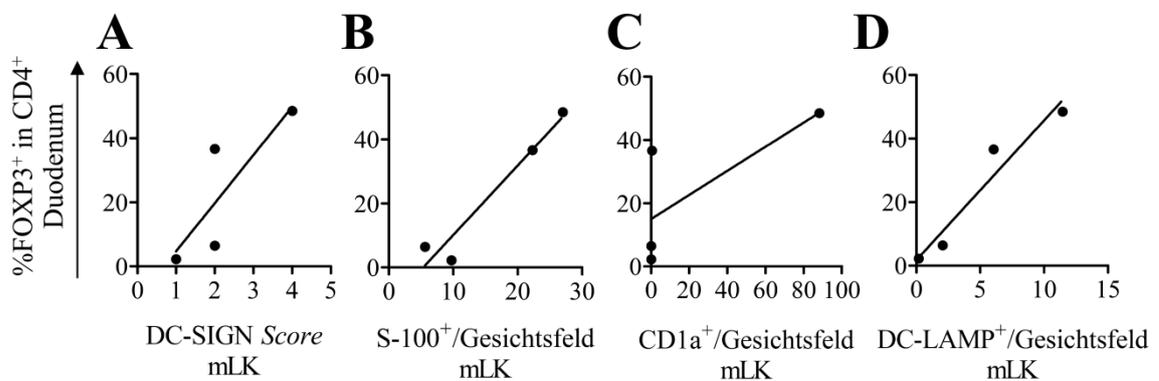


Abb. 4.4: Zusammenhang zwischen DC-Populationen im mesenterialen Lymphknoten und der Präsenz von T_{reg} im Duodenum von MW-Patienten

In Präparaten mesenterialer Lymphknoten (mLK) von unbehandelten MW-Patienten wurden die Anzahl S-100⁺ (B), CD1a⁺ (C) und DC-LAMP⁺ (D) Zellen pro Gesichtsfeld sowie der DC-SIGN Score (A; Erklärung siehe Abb. 3.16) immunhistochemisch bestimmt und jeweils in Bezug zur korrespondierenden Anzahl FOXP3⁺ Zellen pro Gesichtsfeld in Duodenalbiopsien derselben Patienten gebracht. Die lineare Regressionsgerade zeigt die Tendenz zu einer positiven Assoziation der Untersuchungsgrößen.

T-Zellenergie

Sowohl T_{reg} als auch tolerogene Antigen präsentierende Zellen können den Phänotyp und die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen beeinflussen. Zudem löst eine persistierende systemisch erhöhte Antigen-Konzentration in den Effektor-T-Zellen Anergie oder Erschöpfung aus [254, 265].

Die massive systemische Besiedlung mit *T. whipplei* führte in MW-Patienten zu einem erhöhten Anteil an aktivierten CD4⁺ Effektor-T-Zellen im Blut (Abb. 3.25; [336]). Von diesen exprimierte jedoch ein verringerter Anteil den Rezeptor GITR (Abb. 3.25), über den, durch die Bindung von GITR-Ligand auf Antigen präsentierenden Zellen, kostimulatorische Signale vermittelt werden [261, 262]. Signale über GITR/GITR-Ligand erhöhen die Resistenz von CD4⁺ Effektor-T-Zellen gegenüber der T_{reg}-vermittelten Suppression - insbesondere bei der Initiierung von Immunantworten [263]. Aufgrund der verringerten GITR-Expression scheinen aktivierte CD4⁺ Effektor-T-Zellen in MW-Patienten also anfälliger gegenüber Suppression und weniger empfänglich für Proliferationsstimuli in Form von GITR-Ligand zu sein [263, 494].

Zudem exprimierten bei unbehandelten MW-Patienten 67 % der aktivierten CD4⁺ Effektorzellen den Erschöpfungsmarker PD-1 [285, 275], im Gegensatz zu 40 % bei Gesunden (Abb. 3.25), was auf einen Überschuss an erschöpften CD4⁺ Effektor-T-Zellen infolge der persistierenden *T. whipplei*-Infektion hindeutet [270]. Bei Patienten mit chronischer Hepatitis C ist die Expression von PD-1 auf CD4⁺ T-Zellen mit einer fehlenden Ansprechbarkeit auf Impfungen verbunden [495] und in HIV-Patienten korreliert die PD-1-Expression auf HIV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen mit der Viruslast im Serum [496]. Auch anerge T-Zellen sind (neben T_{reg}) in der Lage, in DC die Reifung und die Fähigkeit zur T-Zellstimulation zu supprimieren [497].

Auf der Oberfläche der CD4⁺ Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen von MW-Patienten war vor Therapiebeginn die Expression von CD95, dem Rezeptor für Fas-Ligand-induzierte Apoptose-Signale [397], transient erhöht (Abb. 3.25). Insbesondere bei chronischen Infektionen ist der über Zellkontakte vermittelte Zelltod aktivierter Lymphozyten ein wichtiger Kontrollmechanismus zur Verhinderung pathologischer Immunantworten [397]. Entsprechend sind CD4⁺ T-Zellen mit einem Effektor-/Gedächtnisphänotyp besonders empfänglich für Apoptose [269], was auch die verringerte Anzahl an T_{EM} im Blut von unbehandelten MW-Patienten erklären würde (Abb. 3.18). Im Gegensatz zu Th1-Zellen exprimieren Th2-polarisierte T-Zellen weniger CD95 und sind nahezu resistent gegenüber Apoptose-Signalen durch CD95/Fas-Ligand [498]. Dies könnte auch der Grund für die in MW-Patienten beobachtete Tendenz zur Verschiebung in Richtung Th2-Polarisierung sein [355, 354]. Die Erschöpfung der CD4⁺ T-Zellen manifestierte sich in unbehandelten MW-Patienten in transient verringerten Th1- und Th17-Antworten auf die polyklonale Stimulation mit dem Superantigen SEB (Abb. 3.26). Auch Th1-Antworten auf die *Recall*-Antigene CMV und Tuberkulin waren in unbehandelten MW-Patienten vermindert, erreichten aber, ebenso wie polyklonale Th1- und Th17-Reaktionen, nach der Therapie wieder das Niveau von gesunden Kontrollpersonen (Abb. 3.26). Diese transiente Anergie blieb in früheren Arbeiten unentdeckt, da aufgrund geringerer Patientenzahlen keine Einteilung in unbehandelte und behandelte MW-Patienten vorgenommen worden war [336]. Die Beseitigung des Erregers, der Rückgang der T_{reg}-Aktivierung und die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in Effektor-/Gedächtniszellen infolge der Therapie bewirken schließlich eine Wiederherstellung der Reaktivität.

Die vorliegende Arbeit liefert erstmals Hinweise für eine Beteiligung von T_{reg} an der Pathogenese des MW. Vor Therapiebeginn treten T_{reg} in der duodenalen Mukosa in erhöhter Anzahl auf und zeigen im peripheren Blut eine erhöhte Aktivierung. Obwohl T_{reg} in MW-Patienten nicht spezifisch die Th1-Reaktivität gegen *T. whipplei* zu supprimieren scheinen, könnten sie durch die Modulation von Antigen präsentierenden Zellen und Effektorzellen vor einer exzessiven Entzündung schützen, welche bei der massiven systemischen Ausbreitung von *T. whipplei* fatale Folgen für die betroffenen Organsysteme hätte. In der Folge sind $CD4^+$ Effektor-T-Zellen in MW-Patienten anfälliger gegenüber Suppression und weniger empfänglich für Stimulation.

4.8 Modell für die Rolle dendritischer Zellen und regulatorischer T-Zellen in der Pathogenese des Morbus Whipple

Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse wurde ein Modell für die Beeinflussung der Pathogenese des MW durch DC und T-Zellregulation erstellt (Abb. 4.5).

Durch das Epithel eingedrungene *T. whipplei* werden in der Lamina propria des Duodenum von myeloiden DC-Populationen und Makrophagen aufgenommen und in endosomalen Kompartimenten prozessiert (Abb. 4.5 I). Die Erkennung molekularer Strukturen von *T. whipplei* über entsprechende PRR induziert nur eine schwache Ausreifung der DC (Abb. 4.5 II). Reifende DC wandern über afferente Lymphbahnen in die angrenzenden mesenterialen Lymphknoten ein (Abb. 4.5 III). Indes wird die DC-Population in der Lamina propria durch rekrutierte DC-Vorläufer, vor allem aber durch Monozyten, die zu Mo-DC differenzieren, wieder aufgefüllt.

Im Paracortex treffen die DC auf naive $CD4^+$ T-Zellen, die sie unter optimalen Bedingungen über die Präsentation von *T. whipplei*-Antigenpeptiden und kostimulatorische Signale aktivieren würden. Da die vollständige Ausreifung der DC durch den schwachen Pathogen-Stimulus und das regulatorische Zytokinmilieu ($IFN-\gamma$ reduziert, IL-10 erhöht) beeinträchtigt ist und die DC aufgrund eines intrinsischen Defekts nicht ausreichend IL-12 produzieren, erfolgt die T-Zellaktivierung unter suboptimalen Bedingungen (Abb. 4.5 IV). Folglich werden in lymphatischen Organen statt der protektiven Th1-Antworten schwache Th2-Antworten induziert [354, 499]. Ein großer Teil der $CD4^+$ Effektor-T-Zellen entwickelt jedoch einen anergen Phänotyp und geht wahrscheinlich durch Apoptose zugrunde (Abb. 4.5 V). Ein anderer Teil der $CD4^+$ Effektor-T-Zellen differenziert unter dem Einfluss des anti-inflammatorischen Zytokinmilieus zu T_{reg} , welche über die efferenten Lymphbahnen und den Blutstrom in den Darm einwandern (Abb. 4.5 VI). In der Lamina propria fördern T_{reg} die alternative Aktivierung der Makrophagen, supprimieren die Th-Aktivität und hemmen die Reifung der DC, was wiederum die Persistenz von *T. whipplei* begünstigt (Abb. 4.5 VII). Umgekehrt wird die Expansion und Aktivierung der T_{reg} in der Lamina propria durch alternativ aktivierte Makrophagen, die IL-10 und TGF- β sekretieren, gefördert. Zusätzlich verhindert das systemisch anti-inflammatorische

Zytokinmilieu in MW-Patienten die Aktivierung der DC, begünstigt die alternative Aktivierung der Makrophagen und trägt zur Aufrechterhaltung der suppressiven Aktivität der T_{reg} , sowie der Hyporesponsivität der Th-Zellen bei.

Die Ausbreitung von *T. whipplei* auf periphere Gewebe und ZNS erfolgt über Blut-Monozyten, die über Hochendothelvenolen durch die Lymphknoten zirkulieren und dort *T. whipplei* aufnehmen, könnte aber auch über *T. whipplei*-tragende DC stattfinden, die aus der Lamina propria über Lymphknoten und efferente Lymphe zurück in die Blutbahn gelangen (Abb. 4.5 VIII). Bei einer massiven systemischen Besiedlung durch *T. whipplei* üben T_{reg} schließlich eine protektive Funktion aus, da sie das Gewebe vor der Zerstörung durch exzessive Entzündungsreaktionen bewahren.

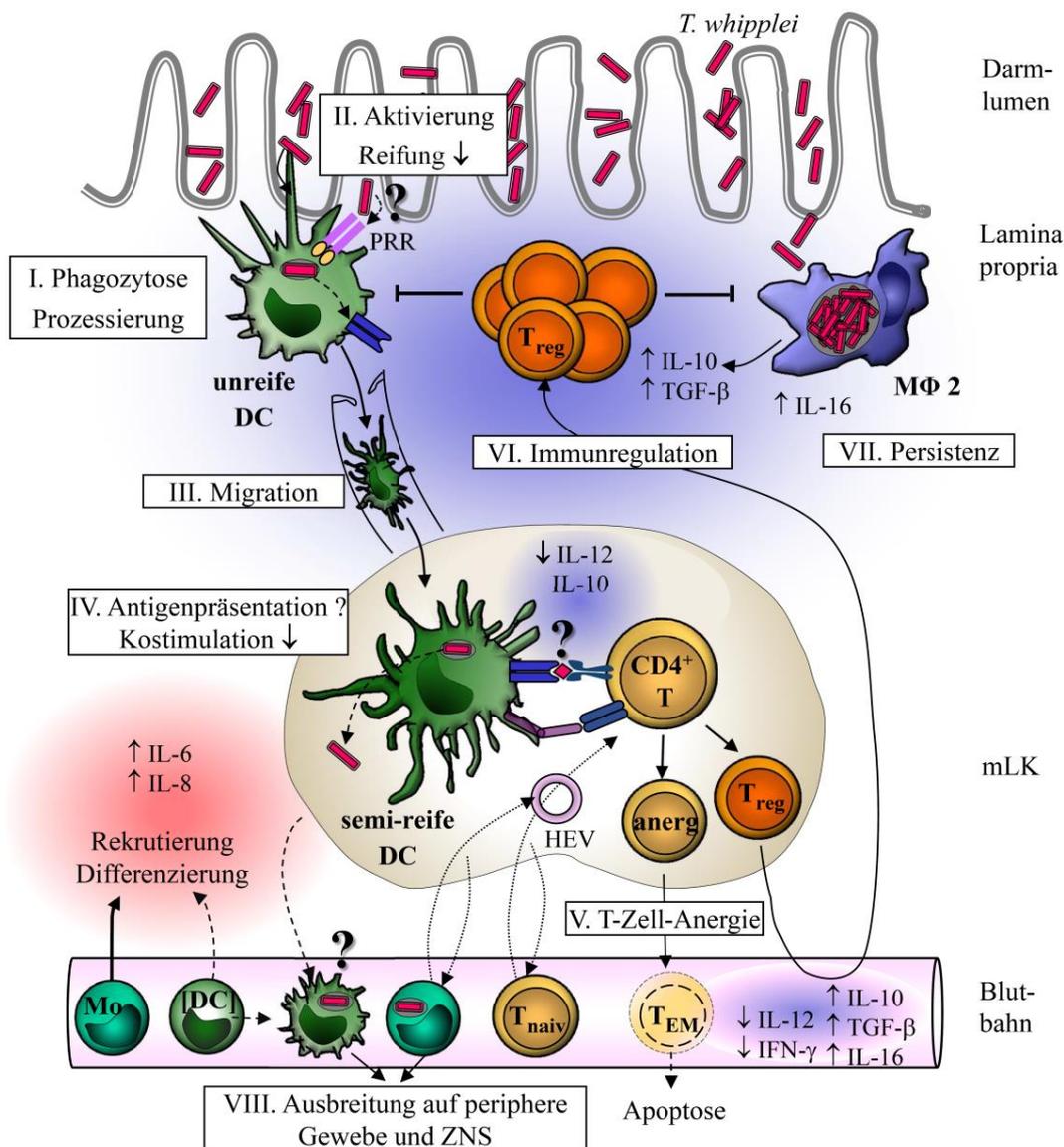


Abb. 4.5: Modell für die Beeinflussung der Immunpathogenese des MW durch DC und T-Zellregulation
 [DC], DC-Vorläufer; HEV, Hochendothelvenolen; mLK, mesenterialer Lymphknoten; MΦ, Makrophagen; Mo, Monozyten; PRR, pattern recognition receptor; T_{EM}, effector memory T cells; T_{naiv}, naive T-Zellen; T_{reg}, regulatorische T-Zellen.

5 Zusammenfassung

Morbus Whipple (MW) ist eine chronische systemische Infektion mit dem ubiquitär vorkommenden Bakterium *Tropheryma (T.) whipplei*, die sich vor allem im Gastrointestinaltrakt, den Gelenken und dem Zentralnervensystem (ZNS) manifestiert [289]. Während selbst-limitierende Infektionen mit *T. whipplei* häufig vorkommen [333, 334] und zu einer protektiven Immunität führen [336, 311], ist eine chronische Manifestation der Infektion in Form des MW extrem selten und scheint mit prädisponierenden immunologischen Faktoren assoziiert zu sein. Kennzeichnend für MW-Patienten ist die massive Infiltration der duodenalen Mukosa mit *T. whipplei*-gefüllten alternativ aktivierten Makrophagen [338], die systemisch reduzierte Konzentration von Interleukin (IL)-12p40 [353] und das Fehlen einer *T. whipplei*-spezifischen T-Helferzell (Th) Typ 1-Antwort [336].

Obwohl dendritische Zellen (DC) für die Initiierung von Th-Antworten zur Abwehr pathogener Bakterien essenziell sind [20], war bislang nichts über ihre Rolle in der Pathogenese des MW bekannt. Ebenfalls unklar war, ob regulatorische T-Zellen (T_{reg}) bei MW-Patienten an der Suppression von Th-Antworten und der Kontrolle entzündlicher Prozesse beteiligt sind. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, DC von MW-Patienten hinsichtlich der Verteilung in Blut und Geweben, der Funktionalität und deren Beeinflussung durch *T. whipplei* zu untersuchen sowie Veränderungen der $CD4^+$ T-Zellpopulation und suppressive Effekte durch T_{reg} bei MW-Patienten zu analysieren.

Im Blut von MW-Patienten zeigten myeloide DC (M-DC) und plasmazytoide DC (P-DC), ebenso wie in Gesunden, einen unreifen Phänotyp. Die M-DC waren jedoch bei MW-Patienten vor Beginn der Antibiotika-Therapie in ihrem Anteil reduziert und reagierten mit einer verringerten Ausreifung und IL-12-Produktion auf die Stimulation mit dem Toll-ähnlichen Rezeptor (TLR) 4-Liganden Lipopolysaccharid (LPS). Aus Monozyten *in vitro* generierte DC (Mo-DC) von MW-Patienten unterschieden sich nicht hinsichtlich Phänotyp, Endozytosekapazität sowie der Fähigkeit zur Aktivierung Antigen-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen von denen gesunder Kontrollpersonen. Allerdings sekretierten die Mo-DC von MW-Patienten signifikant weniger IL-12p70 und die Kokultur von Mo-DC und autologen T-Zellen führte nur bei Kontrollpersonen, nicht aber bei MW-Patienten zur Induktion einer *T. whipplei*-spezifischen Th1-Reaktion. Sowohl *in vitro* als auch *in situ* wurde gezeigt, dass DC *T. whipplei*-Bakterien aufnehmen. *In vitro* wirkte *T. whipplei* als schwacher Reifungsstimulus auf M-DC und Mo-DC. In M-DC konnte *T. whipplei* allein nicht die Produktion von IL-12 und IL-23 induzieren. Dagegen verstärkte *T. whipplei* in Kombination mit pro-inflammatorischen Zytokinen die Sekretion von IL-10 in Mo-DC. In der duodenalen Mukosa von MW-Patienten war die Anzahl der DC-SIGN⁺ und S-100⁺ DC im Vergleich zu Kontrollpersonen nicht verändert. Lymphknoten mit einer *T. whipplei*-Besiedlung wiesen jedoch strukturelle Veränderungen auf, wie den Verlust von Keimzentren, die Erweiterung der Lymphgefäße oder die Bildung von Granulomen. Diese wurden von einer Abnahme der Anzahl an interdigitierenden DC und einer Verringerung der Proliferation begleitet. Entsprechend zeigten MW-Patienten vor der Behandlung auch eine verringerte Anzahl an

CD4⁺ T-Zellen im Blut. Diese Reduktion betraf insbesondere die Effektor-/Gedächtnis-Subpopulation (T_{EM}) und die CD31⁺ naiven Zellen, die einen hohen Anteil an *recent thymic emigrants* (RTE) enthalten [199]. Während die T_{EM}-Population nach erfolgreicher Therapie wieder zunahm, blieb die mit der Thymusleistung assoziierte Anzahl der CD31⁺ naiven CD4⁺ T-Zellen in MW-Patienten gering. Zudem waren bei MW-Patienten, unabhängig vom Therapiestatus, sowohl der Anteil der zirkulierenden CD4⁺ T-Zellen mit Darmtropismus als auch die Anzahl der CD4⁺ und CD45RO⁺ Zellen im Duodenum verringert. Im Gegensatz dazu zeigten MW-Patienten initial im Vergleich zu Kontrollpersonen eine lokal erhöhte Anzahl an FOXP3⁺ T_{reg} im Duodenum. Im Blut der MW-Patienten unterschied sich der Anteil der T_{reg} an der CD4⁺ Population nicht von dem der gesunden Kontrollpersonen. Dafür zeichneten sich die zirkulierenden T_{reg} von MW-Patienten durch eine erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern aus und waren effizientere Suppressoren der Th1 und Th17-Aktivierung als T_{reg} von Kontrollpersonen. Die Depletion der T_{reg} hatte jedoch, sowohl bei MW-Patienten als auch bei Kontrollpersonen, keinen Einfluss auf die *T. whipplei*-spezifische Th1-Reaktivität. Aktivierte T-Zellen nahmen im Blut von MW-Patienten im Vergleich zu Gesunden zwar einen höheren Anteil an der CD4⁺-Population ein, zeigten aber einen anergen Phänotyp und eine transient reduzierte Reaktivität gegenüber dem Superantigen Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) und *Recall*-Antigenen wie Cytomegalievirus (CMV) und Tuberkulin. Während die reduzierte polyklonale und Antigen-spezifische Reaktivität durch die Behandlung mit Antibiotika wiederhergestellt werden konnte, blieb die fehlende *T. whipplei*-spezifische Th1-Antwort der MW-Patienten bestehen.

Diese Arbeit beschreibt erstmals eine Beteiligung von DC und T_{reg} an der Pathogenese des MW. Myeloide DC-Formen tragen in Geweben zur Aufnahme und systemischen Verbreitung von *T. whipplei* bei. Aufgrund ihrer reduzierten IL-12-Produktion scheinen DC für die verringerte Th1-Polarisierung und die Anergie der CD4⁺ T-Zellen verantwortlich zu sein. Die erhöhte Anzahl an T_{reg} in der duodenalen Mukosa und das systemisch erhöhte regulatorische Potenzial der T_{reg} könnten einerseits die Ausreifung der DC und die Aktivierung der CD4⁺ Effektor-T-Zellen supprimieren, andererseits aber auch die Gewebe vor einer Zerstörung durch exzessive Entzündungsprozesse in Reaktion auf die massive Ausbreitung von *T. whipplei* bewahren.

Summary

Whipple's disease (WD) is a chronic systemic infection with the ubiquitous bacterium *Tropheryma (T.) whipplei* which mainly manifests in the gastrointestinal tract, joints and central nervous system [289]. While self-limiting infections with *T. whipplei* occur frequently [333, 334] and lead to a protective immunity [336, 311], a chronic manifestation of the infection in the form of WD is rare and seems to be associated with predisposing immunological factors. Characteristic for WD patients is a massive infiltration of the duodenal mucosa by *T. whipplei*-filled alternatively activated macrophages, a systemic reduced concentration of interleukin (IL)-12p40 [353], and the lack of a *T. whipplei*-specific T helper cell (Th) type 1 response [336].

Although dendritic cells (DC) are essential for the initiation of Th responses against pathogenic bacteria [20], nothing was known so far about their role in the pathogenesis of WD. It was also unclear, if regulatory T cells (T_{reg}) were involved in the suppression of Th responses and the control of inflammatory processes in WD patients. Therefore the aim of this thesis was to examine DC from WD patients regarding their distribution in blood and tissues, their functionality and their manipulation by *T. whipplei* as well as to analyse alterations in the $CD4^+$ T cell population and suppressive effects by T_{reg} in patients with WD.

Circulating blood myeloid DC (M-DC) and plasmacytoid DC (P-DC) from WD patients showed an immature phenotype as observed also in healthy controls. However, in blood from WD patients M-DC were reduced in their portion before the onset of antibiotic therapy and reacted with a decreased maturation and IL-12 production towards the stimulation with the Toll-like receptor (TLR) 4-ligand lipopolysaccharide (LPS). *In vitro* differentiated monocyte-derived DC (Mo-DC) from WD patients and healthy control subjects did not differ with respect to phenotype, endocytotic capacity and the ability to activate antigen-specific $CD4^+$ T cells. Nevertheless, Mo-DC from WD patients secreted less IL-12p70 and unlike in control subjects, coculture of Mo-DC and autologous T cells did not lead to the induction of a *T. whipplei*-specific Th1 reaction in WD patients. The uptake of *T. whipplei* bacteria by DC was shown both *in vitro* and *in situ*. *In vitro* *T. whipplei* acted as a weak stimulus for the maturation of M-DC and Mo-DC. In M-DC, *T. whipplei* alone was not able to induce the production of IL-12 and IL-23. But together with pro-inflammatory cytokines, *T. whipplei* augmented the secretion of IL-10 by Mo-DC. Within the duodenal mucosa from WD patients the number of DC-SIGN⁺ and S-100⁺ DC was not altered as compared to control subjects. However, lymph nodes colonised with *T. whipplei* exhibited structural changes such as the loss of germ centres, dilatation of lymph vessels or the formation of granulomas. These changes were accompanied by decreased numbers of interdigitating DC and diminished proliferation. Accordingly, WD patients showed a reduced number of $CD4^+$ T cells in blood. This reduction concerned particularly the effector/memory subpopulation (T_{EM}) and the $CD31^+$ naïve cells, which contain a high proportion of recent thymic emigrants (RTE) [199]. While the T_{EM} population rose again after successful therapy, the number of

CD31⁺ naïve CD4⁺ T cells associated with thymic output remained low in WD patients. Moreover, both the portion of circulating CD4⁺ T cells expressing marker for intestinal homing and the number of CD4⁺ and CD45RO⁺ cells in the duodenum were reduced in WD patients irrespective of their treatment status. In contrast, WD patients initially showed an increased number of FOXP3⁺ T_{reg} in the duodenum as compared to control subjects. In the peripheral blood the portion of T_{reg} within the CD4⁺ population did not differ between WD patients and healthy control subjects. Circulating T_{reg} from WD patients showed an increased expression of activation markers and were more efficient suppressors of Th1 and Th17 activation than T_{reg} from control subjects. However, the depletion of T_{reg} did not affect the *T. whipplei*-specific Th1 reactivity in CD4⁺ T cells from WD patients and controls. Activated T cells composed a higher part within the CD4⁺ population in the blood from WD patients as compared to healthy persons, but showed an anergic phenotype and a transiently reduced reactivity towards the superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB) and recall antigens like cytomegalovirus (CMV) and tuberculin. While the reduced polyclonal and antigen-specific reactivity could be reconstituted through the treatment with antibiotics, the lack of the *T. whipplei*-specific Th1 response persisted in WD patients.

This work describes for the first time the involvement of DC and T_{reg} in the pathogenesis of WD. Within the tissue, myeloid DC populations contribute to the uptake and systemic spread of *T. whipplei*. Due to their reduced IL-12 production, DC seem to be responsible for the diminished Th1 polarisation and the anergy of CD4⁺ T cells. The elevated numbers of T_{reg} in the duodenal mucosa and the systemically increased regulatory potential of T_{reg} might on the one hand suppress the maturation of DC and the activation of CD4⁺ effector T cells, but on the other hand also prevent tissue damage caused by an excessive inflammation in response to the massive spread of *T. whipplei*.

6 Literaturverzeichnis

- [1] R. Medzhitov, "Recognition of microorganisms and activation of the immune response," *Nature*, vol. 449, no. 7164, pp. 819-826, 2007.
- [2] T. D. Kanneganti, M. Lamkanfi and G. Nunez, "Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease," *Immunity*, vol. 27, no. 4, pp. 549-559, 2007.
- [3] J. d. Dunnen, S. I. Gringhuis and T. B. Geijtenbeek, "Dusting the sugar fingerprint: C-type lectin signaling in adaptive immunity," *Immunol. Lett.*, vol. 128, no. 1, pp. 12-16, 2010.
- [4] T. Kaisho and S. Akira, "Pleiotropic function of Toll-like receptors," *Microbes Infect.*, vol. 6, no. 15, pp. 1388-1394, 2004.
- [5] A. Ben Nasr, J. Haithcoat, J. E. Masterson, J. S. Gunn, T. Eaves-Pyles and G. R. Klimpel, "Critical role for serum opsonins and complement receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in phagocytosis of *Francisella tularensis* by human dendritic cells (DC): uptake of *Francisella* leads to activation of immature DC and intracellular survival of the bacteria," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 80, no. 4, pp. 774-786, 2006.
- [6] R. S. Flannagan, G. Cosio and S. Grinstein, "Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 5, pp. 355-366, 2009.
- [7] C. M. Rosenberger and B. B. Finlay, "Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, no. 5, pp. 385-396, 2003.
- [8] J. Neefjes, M. L. Jongsma, P. Paul and O. Bakke, "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 12, pp. 823-836, 2011.
- [9] E. Vivier and B. Malissen, "Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited," *Nat. Immunol.*, vol. 6, no. 1, pp. 17-21, 2005.
- [10] L. A. Zenewicz and H. Shen, "Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview," *Microbes Infect.*, vol. 9, no. 10, pp. 1208-1215, 2007.
- [11] F. Sallusto, J. Geginat and A. Lanzavecchia, "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 22, pp. 745-763, 2004.
- [12] S. K. Mazmanian and D. L. Kasper, "The love-hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, no. 11, pp. 849-858, 2006.
- [13] N. Joller, S. S. Weber and A. Oxenius, "Antibody-Fc receptor interactions in protection against intracellular pathogens," *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, no. 4, pp. 889-897, 2011.
- [14] K. Alexandropoulos and N. M. Danzl, "Thymic epithelial cells: antigen presenting cells that regulate T cell repertoire and tolerance development," *Immunol Res*, p. , 2012.
- [15] A. M. Norment, R. D. Salter, P. Parham, V. H. Engelhard and D. R. Littman, "Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules," *Nature*, vol. 336, no. 6194, pp. 79-81, 1988.
- [16] M. Barry and R. C. Bleackley, "Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 6, pp. 401-409, 2002.
- [17] J. Pardo, J. I. Aguilo, A. Anel, P. Martin, L. Joeckel, C. Borner, R. Wallich, A. Mullbacher, C. J. Froelich and M. M. Simon, "The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation," *Microbes Infect.*, vol. 11, no. 4, pp. 452-459, 2009.

- [18] C. Doyle and J. L. Strominger, "Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion," *Nature*, vol. 330, no. 6145, pp. 256-259, 1987.
- [19] F. Annunziato and S. Romagnani, "Heterogeneity of human effector CD4+ T cells," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 11, no. 6, p. 257, 2009.
- [20] J. Banchereau and R. M. Steinman, "Dendritic cells and the control of immunity," *Nature*, vol. 392, no. 6673, pp. 245-252, 1998.
- [21] D. H. Schuurhuis, N. Fu, F. Ossendorp and C. J. Melief, "Ins and outs of dendritic cells," *Int. Arch. Allergy Immunol.*, vol. 140, no. 1, pp. 53-72, 2006.
- [22] E. C. de Jong, P. L. Vieira, P. Kalinski, J. H. Schuitemaker, Y. Tanaka, E. A. Wierenga, M. Yazdanbakhsh and M. L. Kapsenberg, "Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals," *J. Immunol.*, vol. 168, no. 4, pp. 1704-1709, 2002.
- [23] Y. Belkaid and G. Oldenhove, "Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells," *Immunity*, vol. 29, pp. 362-371, 2008.
- [24] J. Banchereau, F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka, "Immunobiology of dendritic cells," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 18, pp. 767-811, 2000.
- [25] K. Inaba, M. Pack, M. Inaba, H. Sakuta, F. Isdell and R. M. Steinman, "High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes," *J. Exp. Med.*, vol. 186, no. 5, pp. 665-672, 1997.
- [26] C. Reis e Sousa, C. Hieny, T. Schariton-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R. N. Germain and A. Sher, "In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas," *J. Exp. Med.*, vol. 186, no. 11, pp. 1819-1829, 1997.
- [27] P. Langerhans, "Ueber die Nerven der menschlichen Haut," *Virchows Arch Pathol Anat*, vol. 44, p. 325-337, 1868.
- [28] R. M. Steinman and Z. A. Cohn, "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution," *J. Exp. Med.*, vol. 137, no. 5, pp. 1142-1162, 1973.
- [29] H. Ueno, E. Klechevsky, R. Morita, C. Aspod, T. Cao, T. Matsui, T. D. Pucchio, J. Connolly, J. W. Fay, V. Pascual, A. K. Palucka and J. Banchereau, "Dendritic cell subsets in health and disease," *Immunol. Rev.*, vol. 219, pp. 118-142, 2007.
- [30] M. Cella, F. Facchetti, A. Lanzavecchia and M. Colonna, "Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization," *Nat. Immunol.*, vol. 1, no. 4, pp. 305-310, 2000.
- [31] A. Dzionek, Y. Inagaki, K. Okawa, J. Nagafune, J. Rock, Y. Sohma, G. Winkels, M. Zysk, Y. Yamaguchi and J. Schmitz, "Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions," *Hum. Immunol.*, vol. 63, pp. 1133-1148, 2002.
- [32] A. Krug, A. Towarowski, S. Britsch, S. Rothenfusser, V. Hornung, R. Bals, T. Giese, H. Engelmann, S. Endres, A. M. Krieg and G. Hartmann, "Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12," *Eur. J. Immunol.*, vol. 31, no. 10, pp. 3026-3037, 2001.
- [33] P. S. Jaehn, K. S. Zaenker, J. Schmitz and A. Dzionek, "Functional dichotomy of plasmacytoid dendritic cells: antigen-specific activation of T cells versus production of type I interferon," *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, pp. 1822-1832, 2008.
- [34] W. Barchet, M. Cella and M. Colonna, "Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity," *Semin. Immunol.*, vol. 17, no. 4, pp. 253-261, 2005.

- [35] B. Jahrsdorfer, A. Vollmer, S. E. Blackwell, J. Maier, K. Sontheimer, T. Beyer, B. Mandel, O. Lunov, K. Tron, G. U. Nienhaus, T. Simmet, K. M. Debatin, G. J. Weiner and D. Fabricius, "Granzyme B produced by human plasmacytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion," *Blood*, vol. 115, no. 6, pp. 1156-1165, 2010.
- [36] E. A. Moseman, X. Liang, A. J. Dawson, A. Panoskaltsis-Mortari, A. M. Krieg, Y. J. Liu, B. R. Blazar and W. Chen, "Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells," *J. Immunol.*, vol. 173, no. 7, pp. 4433-4442, 2004.
- [37] K. P. MacDonald, D. J. Munster, G. J. Clark, A. Dzionek, J. Schmitz and D. N. Hart, "Characterization of human blood dendritic cell subsets," *Blood*, vol. 100, pp. 4512-4520, 2002.
- [38] M. Lindstedt, K. Lundberg and C. A. Borrebaeck, "Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 8, pp. 4839-4846, 2005.
- [39] D. Piccioli, S. Tavarini, E. Borgogni, V. Steri, S. Nuti, C. Sammiceli, M. Bardelli, D. Montagna, F. Locatelli and A. Wack, "Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets," *Blood*, vol. 109, no. 12, pp. 5371-5379, 2007.
- [40] K. Schäkel, R. Kannagi, B. Kniep, Y. Goto, C. Mitsuoka, J. Zwirner, A. Soruri, M. v. Kietzell and E. Rieber, "6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells," *Immunity*, vol. 17, pp. 289-301, 2002.
- [41] K. Schäkel, M. v. Kietzell, A. Hansel, A. Ebling, L. Schulze, M. Haase, C. Semmler, M. Sarfati, A. N. Barclay, G. J. Randolph, M. Meurer and E. P. Rieber, "Human 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells are principal producers of early interleukin-12 and are controlled by erythrocytes," *Immunity*, vol. 24, no. 6, pp. 767-777, 2006.
- [42] A. de Baey, I. Mende, G. Baretton, A. Greiner, W. H. Hartl, P. A. Baeuerle and H. M. Diepolder, "A subset of human dendritic cells in the T cell area of mucosa-associated lymphoid tissue with a high potential to produce TNF-alpha," *J. Immunol.*, vol. 170, no. 10, pp. 5089-5094, 2003.
- [43] D. B. Moody, T. Ulrichs, W. Muhlecker, D. C. Young, S. S. Gurcha, E. Grant, J. P. Rosat, M. B. Brenner, C. E. Costello, G. S. Besra and S. A. Porcelli, "CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in Mycobacterium tuberculosis infection," *Nature*, vol. 404, no. 6780, pp. 884-888, 2000.
- [44] S. H. Park and A. Bendelac, "CD1-restricted T-cell responses and microbial infection," *Nature*, vol. 406, no. 6797, pp. 788-792, 2000.
- [45] G. Penna, M. Vulcano, A. Roncari, F. Facchetti, S. Sozzani and L. Adorini, "Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells," *J. Immunol.*, vol. 169, no. 12, pp. 6673-6676, 2002.
- [46] M. Jefford, M. Schnurr, T. Toy, K. A. Masterman, A. Shin, T. Beecroft, T. Y. Tai, K. Shortman, M. Shackleton, I. D. Davis, P. Parente, T. Luft, W. Chen, J. Cebon and E. Maraskovsky, "Functional comparison of DCs generated in vivo with Flt3 ligand or in vitro from blood monocytes: differential regulation of function by specific classes of physiologic stimuli," *Blood*, vol. 102, pp. 1753-1763, 2003.
- [47] A. Dzionek, A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D. W. Buck and J. Schmitz, "BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood," *J. Immunol.*, vol. 165, pp. 6037-6046, 2000.
- [48] M. Delvaeye, M. Noris, A. D. Vriese, C. T. Esmon, N. L. Esmon, G. Ferrell, J. Del-Favero, S. Plaisance, B. Claes, D. Lambrechts, C. Zoja, G. Remuzzi and E. M. Conway, "Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome," *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, no. 4, pp. 345-357, 2009.

- [49] S. T. Yerkovich, M. Roponen, M. E. Smith, K. McKenna, A. Bosco, L. S. Subrata, E. Mamessier, M. E. Wikstrom, P. L. Souef, P. D. Sly, P. G. Holt and J. W. Upham, "Allergen-enhanced thrombomodulin (blood dendritic cell antigen 3, CD141) expression on dendritic cells is associated with a TH2-skewed immune response," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 123, pp. 209-216, 2009.
- [50] S. L. Jongbloed, A. J. Kassianos, K. J. McDonald, G. J. Clark, X. Ju, C. E. Angel, C. J. Chen, P. R. Dunbar, R. B. Wadley, V. Jeet, A. J. Vulink, D. N. Hart and K. J. Radford, "Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens," *J. Exp. Med.*, vol. 207, pp. 1247-1260, 2010.
- [51] J. Haller Hasskamp, J. L. Zapas and E. G. Elias, "Dendritic cell counts in the peripheral blood of healthy adults," *Am. J. Hematol.*, vol. 78, no. 4, pp. 314-315, 2005.
- [52] K. Liu and M. C. Nussenzweig, "Origin and development of dendritic cells," *Immunol. Rev.*, vol. 234, pp. 45-54, 2010.
- [53] R. M. Steinman and M. C. Nussenzweig, "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 99, pp. 351-358, 2002.
- [54] D. C. Baumgart, D. Metzke, J. Schmitz, A. Scheffold, A. Sturm, B. Wiedenmann and A. U. Dignass, "Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells," *Gut*, vol. 54, pp. 228-236, 2005.
- [55] U. O'Doherty, M. Peng, S. Gezelter, W. J. Swiggard, M. Betjes, N. Bhardwaj and R. M. Steinman, "Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature," *Immunology*, vol. 82, no. 3, pp. 487-493, 1994.
- [56] G. Grouard, M. C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau and Y. J. Liu, "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand," *J. Exp. Med.*, vol. 185, no. 6, pp. 1101-1111, 1997.
- [57] M. I. Verstege, F. J. ten, S. M. Reinartz, C. M. van, F. J. Slors, W. A. Bemelman, F. A. Vyth-Dreese and A. A. te, "Dendritic cell populations in colon and mesenteric lymph nodes of patients with Crohn's disease," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 56, no. 3, pp. 233-241, 2008.
- [58] T. B. Geijtenbeek, R. Torensma, S. J. van, G. C. van, G. J. Adema, Y. v. Kooyk and C. G. Figdor, "Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses," *Cell*, vol. 100, no. 5, pp. 575-585, 2000.
- [59] K. Takahashi, T. Isobe, Y. Ohtsuki, H. Sonobe, I. Takeda and T. Akagi, "Immunohistochemical localization and distribution of S-100 proteins in the human lymphoreticular system," *Am. J. Pathol.*, vol. 116, no. 3, pp. 497-503, 1984.
- [60] A. Engering, T. B. Geijtenbeek, S. J. van, M. Wijers, E. v. Liempt, N. Demaurex, A. Lanzavecchia, J. Franssen, C. G. Figdor, V. Piguuet and Y. v. Kooyk, "The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells," *J. Immunol.*, vol. 168, no. 5, pp. 2118-2126, 2002.
- [61] J. Valladeau, V. Duvert-Frances, J. J. Pin, C. Dezutter-Dambuyant, C. Vincent, C. Massacrier, J. Vincent, K. Yoneda, J. Banchereau, C. Caux, J. Davoust and S. Saeland, "The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface," *Eur. J. Immunol.*, vol. 29, no. 9, pp. 2695-2704, 1999.
- [62] T. Ito, M. Inaba, K. Inaba, J. Toki, S. Sogo, T. Iguchi, Y. Adachi, K. Yamaguchi, R. Amakawa, J. Valladeau, S. Saeland, S. Fukuhara and S. Ikehara, "A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells," *J. Immunol.*, vol. 163, no. 3, pp. 1409-1419, 1999.

- [63] K. Lore, A. Sonnerborg, C. Brostrom, L. E. Goh, L. Perrin, H. McDade, H. J. Stellbrink, B. Gazzard, R. Weber, L. A. Napolitano, Y. v. Kooyk and J. Andersson, "Accumulation of DC-SIGN+CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection," *AIDS*, vol. 16, no. 5, pp. 683-692, 2002.
- [64] B. de Saint-Vis, J. Vincent, S. Vandenabeele, B. Vanbervliet, J. J. Pin, S. Ait-Yahia, S. Patel, M. G. Mattei, J. Banchereau, S. Zurawski, J. Davoust, C. Caux and S. Lebecque, "A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment," *Immunity*, vol. 9, no. 3, pp. 325-336, 1998.
- [65] L. J. Zhou, R. Schwarting, H. M. Smith and T. F. Tedder, "A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily," *J. Immunol.*, vol. 149, no. 2, pp. 735-742, 1992.
- [66] A. Dzionek, Y. Sohma, J. Nagafune, M. Cella, M. Colonna, F. Facchetti, G. Gunther, I. Johnston, A. Lanzavecchia, T. Nagasaka, T. Okada, W. Vermi, G. Winkels, T. Yamamoto, M. Zysk, Y. Yamaguchi and J. Schmitz, "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction," *J. Exp. Med.*, vol. 194, pp. 1823-1834, 2001.
- [67] A. Engering, S. J. van, K. Hebeda, D. G. Jackson, R. Prevo, S. K. Singh, T. B. Geijtenbeek, H. v. Krieken and Y. v. Kooyk, "Dynamic populations of dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-positive immature dendritic cells and liver/lymph node-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-positive endothelial cells in the outer zones of the paracortex of human lymph nodes," *Am. J. Pathol.*, vol. 164, no. 5, pp. 1587-1595, 2004.
- [68] M. E. Smith, J. A. Thomas and W. F. Bodmer, "CD1c antigens are present in normal and neoplastic B-cells," *J. Pathol.*, vol. 156, no. 2, pp. 169-177, 1988.
- [69] P. J. Macardle, Z. Chen, C. Y. Shih, C. M. Huang, H. Weedon, Q. Sun, A. F. Lopez and H. Zola, "Characterization of human leucocytes bearing the IL-3 receptor," *Cell. Immunol.*, vol. 168, no. 1, pp. 59-68, 1996.
- [70] F. Geissmann, M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad and K. Ley, "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells," *Science*, vol. 327, pp. 656-661, 2010.
- [71] K. Liu, C. Waskow, X. Liu, K. Yao, J. Hoh and M. Nussenzweig, "Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice," *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 6, pp. 578-583, 2007.
- [72] K. Liu, G. D. Vitoria, T. A. Schwickert, P. Guermonprez, M. M. Meredith, K. Yao, F. F. Chu, G. J. Randolph, A. Y. Rudensky and M. Nussenzweig, "In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis," *Science*, vol. 324, no. 5925, pp. 392-397, 2009.
- [73] M. Merad, M. G. Manz, H. Karsunky, A. Wagers, W. Peters, I. Charo, I. L. Weissman, J. G. Cyster and E. G. Engleman, "Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions," *Nat. Immunol.*, vol. 3, no. 12, pp. 1135-1141, 2002.
- [74] C. Varol, L. Landsman, D. K. Fogg, L. Greenshtein, B. Gildor, R. Margalit, V. Kalchenko, F. Geissmann and S. Jung, "Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells," *J. Exp. Med.*, vol. 204, no. 1, pp. 171-180, 2007.
- [75] K. R. Siddiqui, S. Laffont and F. Powrie, "E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis," *Immunity*, vol. 32, no. 4, pp. 557-567, 2010.
- [76] B. Leon, M. Lopez-Bravo and C. Ardavin, "Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania," *Immunity*, vol. 26, no. 4, pp. 519-531, 2007.
- [77] H. Nakano, K. L. Lin, M. Yanagita, C. Charbonneau, D. N. Cook, T. Kakiuchi and M. D. Gunn, "Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses," *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 4, pp. 394-402, 2009.

-
- [78] N. V. Serbina, T. P. Salazar-Mather, C. A. Biron, W. A. Kuziel and E. G. Pamer, "TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection," *Immunity*, vol. 19, no. 1, pp. 59-70, 2003.
- [79] C. Caux, B. Vanbervliet, C. Massacrier, C. Dezutter-Dambuyant, B. d. Saint-Vis, C. Jacquet, K. Yoneda, S. Imamura, D. Schmitt and J. Banchereau, "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha," *J. Exp. Med.*, vol. 184, no. 2, pp. 695-706, 1996.
- [80] F. Sallusto and A. Lanzavecchia, "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha," *J. Exp. Med.*, vol. 179, pp. 1109-1118, 1994.
- [81] M. Triantafilou and K. Triantafilou, "Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster," *Trends Immunol.*, vol. 23, no. 6, pp. 301-304, 2002.
- [82] C. C. Chang, A. Wright and J. Punnonen, "Monocyte-derived CD1a+ and CD1a- dendritic cell subsets differ in their cytokine production profiles, susceptibilities to transfection, and capacities to direct Th cell differentiation," *J. Immunol.*, vol. 165, no. 7, pp. 3584-3591, 2000.
- [83] M. Rescigno, M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl and P. Ricciardi-Castagnoli, "Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria," *Nat. Immunol.*, vol. 2, no. 4, pp. 361-367, 2001.
- [84] M. Rescigno and A. D. Sabatino, "Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease," *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 9, pp. 2441-2450, 2009.
- [85] F. Sallusto, M. Cella, C. Danieli and A. Lanzavecchia, "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products," *J. Exp. Med.*, vol. 182, no. 2, pp. 389-400, 1995.
- [86] K. Li, H. Fazekasova, N. Wang, P. Sagoo, Q. Peng, W. Khamri, C. Gomes, S. H. Sacks, G. Lombardi and W. Zhou, "Expression of complement components, receptors and regulators by human dendritic cells," *Mol. Immunol.*, vol. 48, no. 9-10, pp. 1121-1127, 2011.
- [87] F. Nimmerjahn and J. V. Ravetch, "Fcgamma receptors: old friends and new family members," *Immunity*, vol. 24, no. 1, pp. 19-28, 2006.
- [88] A. M. Boruchov, G. Heller, M. C. Veri, E. Bonvini, J. V. Ravetch and J. W. Young, "Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions," *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 10, pp. 2914-2923, 2005.
- [89] A. Cambi, M. Koopman and C. G. Figdor, "How C-type lectins detect pathogens," *Cell. Microbiol.*, vol. 7, no. 4, pp. 481-488, 2005.
- [90] P. Guermonprez, L. Saveanu, M. Kleijmeer, J. Davoust, P. V. Endert and S. Amigorena, "ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells," *Nature*, vol. 425, no. 6956, pp. 397-402, 2003.
- [91] D. C. Barral and M. B. Brenner, "CD1 antigen presentation: how it works," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, no. 12, pp. 929-941, 2007.
- [92] L. Delamarre, M. Pack, H. Chang, I. Mellman and E. S. Trombetta, "Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate," *Science*, vol. 307, no. 5715, pp. 1630-1634, 2005.
- [93] A. Savina and S. Amigorena, "Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells," *Immunol. Rev.*, vol. 219, pp. 143-156, 2007.
- [94] S. Akira, S. Uematsu and O. Takeuchi, "Pathogen recognition and innate immunity," *Cell*, vol. 124, no. 4, pp. 783-801, 2006.
-

- [95] A. Poltorak, X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. V. Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton and B. Beutler, "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene," *Science*, vol. 282, no. 5396, pp. 2085-2088, 1998.
- [96] A. Yoshimura, E. Lien, R. R. Ingalls, E. Tuomanen, R. Dziarski and D. Golenbock, "Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2," *J. Immunol.*, vol. 163, no. 1, pp. 1-5, 1999.
- [97] F. Re and J. L. Strominger, "Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 40, pp. 37692-37699, 2001.
- [98] D. Jarrossay, G. Napolitani, M. Colonna, F. Sallusto and A. Lanzavecchia, "Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells," *Eur. J. Immunol.*, vol. 31, no. 11, pp. 3388-3393, 2001.
- [99] A. Macagno, G. Napolitani, A. Lanzavecchia and F. Sallusto, "Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation," *Trends Immunol.*, vol. 28, no. 5, pp. 227-233, 2007.
- [100] K. S. Kobayashi, M. Chamaillard, Y. Ogura, O. Henegariu, N. Inohara, G. Nunez and R. A. Flavell, "Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract," *Science*, vol. 307, no. 5710, pp. 731-734, 2005.
- [101] G. Napolitani, A. Rinaldi, F. Bertoni, F. Sallusto and A. Lanzavecchia, "Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells," *Nat. Immunol.*, vol. 6, no. 8, pp. 769-776, 2005.
- [102] J. H. Fritz, L. L. Bourhis, G. Sellge, J. G. Magalhaes, H. Fsihi, T. A. Kufer, C. Collins, J. Viala, R. L. Ferrero, S. E. Girardin and D. J. Philpott, "Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity," *Immunity*, vol. 26, no. 4, pp. 445-459, 2007.
- [103] R. M. Steinman and J. Banchereau, "Taking dendritic cells into medicine," *Nature*, vol. 449, no. 7161, pp. 419-426, 2007.
- [104] H. Jonuleit, U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop and A. H. Enk, "Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions," *Eur. J. Immunol.*, vol. 27, no. 12, pp. 3135-3142, 1997.
- [105] P. Kalinski, J. H. Schuitemaker, C. M. Hilkens and M. L. Kapsenberg, "Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation," *J. Immunol.*, vol. 161, no. 6, pp. 2804-2809, 1998.
- [106] L. J. Zhou and T. F. Tedder, "Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily," *J. Immunol.*, vol. 154, no. 8, pp. 3821-3835, 1995.
- [107] A. T. Prectel, N. M. Turza, A. A. Theodoridis and A. Steinkasserer, "CD83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering RNA leads to a diminished T cell stimulation," *J. Immunol.*, vol. 178, no. 9, pp. 5454-5464, 2007.
- [108] A. Chow, D. Toomre, W. Garrett and I. Mellman, "Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane," *Nature*, vol. 418, no. 6901, pp. 988-994, 2002.
- [109] M. C. Dieu, B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque and C. Caux, "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites," *J. Exp. Med.*, vol. 188, no. 2, pp. 373-386, 1998.

- [110] S. Sozzani, P. Allavena, G. D'Amico, W. Luini, G. Bianchi, M. Kataura, T. Imai, O. Yoshie, R. Bonecchi and A. Mantovani, "Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties," *J. Immunol.*, vol. 161, no. 3, pp. 1083-1086, 1998.
- [111] C. Caux, S. Ait-Yahia, K. Chemin, O. d. Bouteiller, M. C. Dieu-Nosjean, B. Homey, C. Massacrier, B. Vanbervliet, A. Zlotnik and A. Vicari, "Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines," *Springer Semin. Immunopathol.*, vol. 22, no. 4, pp. 345-369, 2000.
- [112] D. Alvarez, E. H. Vollmann and U. H. von, "Mechanisms and consequences of dendritic cell migration," *Immunity*, vol. 29, no. 3, pp. 325-342, 2008.
- [113] F. Sallusto, B. Palermo, D. Lenig, M. Miettinen, S. Matikainen, I. Julkunen, R. Forster, R. Burgstahler, M. Lipp and A. Lanzavecchia, "Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function," *Eur. J. Immunol.*, vol. 29, no. 5, pp. 1617-1625, 1999.
- [114] V. W. Chan, S. Kothakota, M. C. Rohan, L. Panganiban-Lustan, J. P. Gardner, M. S. Wachowicz, J. A. Winter and L. T. Williams, "Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells," *Blood*, vol. 93, no. 11, pp. 3610-3616, 1999.
- [115] L. S. Schlesinger and M. A. Horwitz, "Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium," *J. Immunol.*, vol. 147, no. 6, pp. 1983-1994, 1991.
- [116] C. E. van der Poel, R. M. Spaapen, J. G. van and J. H. Leusen, "Functional characteristics of the high affinity IgG receptor, FcγRI," *J. Immunol.*, vol. 186, no. 5, pp. 2699-2704, 2011.
- [117] T. B. Geijtenbeek, D. J. Krooshoop, D. A. Bleijs, S. J. van, G. C. van, V. Grabovsky, R. Alon, C. G. Figdor and Y. v. Kooyk, "DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking," *Nat. Immunol.*, vol. 1, no. 4, pp. 353-357, 2000.
- [118] P. A. Stumbles, D. H. Strickland, C. L. Pimm, S. F. Proksch, A. M. Marsh, A. S. McWilliam, A. Bosco, I. Tobagus, J. A. Thomas, S. Napoli, A. E. Proudfoot, T. N. Wells and P. G. Holt, "Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus," *J. Immunol.*, vol. 167, no. 1, pp. 228-234, 2001.
- [119] S. Yanagihara, E. Komura, J. Nagafune, H. Watarai and Y. Yamaguchi, "EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation," *J. Immunol.*, vol. 161, no. 6, pp. 3096-3102, 1998.
- [120] T. Imai, K. Hieshima, C. Haskell, M. Baba, M. Nagira, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, H. Nomiyama, T. J. Schall and O. Yoshie, "Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion," *Cell*, vol. 91, no. 4, pp. 521-530, 1997.
- [121] S. Dichmann, Y. Herouy, D. Purlis, H. Rheinen, P. Gebicke-Harter and J. Norgauer, "Fractalkine induces chemotaxis and actin polymerization in human dendritic cells," *Inflamm. Res.*, vol. 50, no. 11, pp. 529-533, 2001.
- [122] L. B. Arruda, D. Sim, P. R. Chikhlikar, M. Maciel, K. Akasaki, J. T. August and E. T. Marques, "Dendritic cell-lysosomal-associated membrane protein (LAMP) and LAMP-1-HIV-1 gag chimeras have distinct cellular trafficking pathways and prime T and B cell responses to a diverse repertoire of epitopes," *J. Immunol.*, vol. 177, no. 4, pp. 2265-2275, 2006.
- [123] B. O. Bergholtz and E. Thorsby, "Macrophage-dependent response of immune human T lymphocytes to PPD in vitro. Influence of HLA-D histocompatibility," *Scand. J. Immunol.*, vol. 6, no. 8, pp. 779-786, 1977.

- [124] J. A. Villadangos, P. Schnorrer and N. S. Wilson, "Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces," *Immunol. Rev.*, vol. 207, pp. 191-205, 2005.
- [125] P. Lane, A. Traunecker, S. Hubele, S. Inui, A. Lanzavecchia and D. Gray, "Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes," *Eur. J. Immunol.*, vol. 22, no. 10, pp. 2573-2578, 1992.
- [126] M. Cella, D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia and G. Alber, "Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation," *J. Exp. Med.*, vol. 184, no. 2, pp. 747-752, 1996.
- [127] L. Koulova, E. A. Clark, G. Shu and B. Dupont, "The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4+ T cells," *J. Exp. Med.*, vol. 173, no. 3, pp. 759-762, 1991.
- [128] V. L. Perez, L. V. Parijs, A. Biuckians, X. X. Zheng, T. B. Strom and A. K. Abbas, "Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement," *Immunity*, vol. 6, no. 4, pp. 411-417, 1997.
- [129] M. F. Krummel and J. P. Allison, "CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation," *J. Exp. Med.*, vol. 182, pp. 459-465, 1995.
- [130] M. Azuma, D. Ito, H. Yagita, K. Okumura, J. H. Phillips, L. L. Lanier and C. Somoza, "B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28," *Nature*, vol. 366, no. 6450, pp. 76-79, 1993.
- [131] G. J. Freeman, A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood and T. Honjo, "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation," *J. Exp. Med.*, vol. 192, no. 7, pp. 1027-1034, 2000.
- [132] N. Selenko-Gebauer, O. Majdic, A. Szekeres, G. Hofler, E. Guthann, U. Korthauer, G. Zlabinger, P. Steinberger, W. F. Pickl, H. Stockinger, W. Knapp and J. Stockl, "B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy," *J. Immunol.*, vol. 170, no. 7, pp. 3637-3644, 2003.
- [133] L. Wang, K. Pino-Lagos, V. C. de, I. Guleria, M. H. Sayegh and R. J. Noelle, "Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 105, pp. 9331-9336, 2008.
- [134] T. Hara and A. Miyajima, "Function and signal transduction mediated by the interleukin 3 receptor system in hematopoiesis," *Stem Cells*, vol. 14, no. 6, pp. 605-618, 1996.
- [135] R. Donato, "Intracellular and extracellular roles of S100 proteins," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 60, no. 6, pp. 540-551, 2003.
- [136] A. Langenkamp, M. Messi, A. Lanzavecchia and F. Sallusto, "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells," *Nat. Immunol.*, vol. 1, no. 4, pp. 311-316, 2000.
- [137] M. Kobayashi, L. Fitz, M. Ryan, R. M. Hewick, S. C. Clark, S. Chan, R. Loudon, F. Sherman, B. Perussia and G. Trinchieri, "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes," *J. Exp. Med.*, vol. 170, no. 3, pp. 827-845, 1989.
- [138] G. Trinchieri, "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 2, pp. 133-146, 2003.
- [139] C. S. Hsieh, S. E. Macatonia, C. S. Tripp, S. F. Wolf, A. O'Garra and K. M. Murphy, "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages," *Science*, vol. 260, no. 5107, pp. 547-549, 1993.

- [140] A. Snijders, C. M. Hilkens, T. C. van, M. Engel, L. A. Aarden and M. L. Kapsenberg, "Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit," *J. Immunol.*, vol. 156, no. 3, pp. 1207-1212, 1996.
- [141] A. M. Cooper and S. A. Khader, "IL-12p40: an inherently agonistic cytokine," *Trends Immunol.*, vol. 28, no. 1, pp. 33-38, 2007.
- [142] C. M. Hilkens, P. Kalinski, M. d. Boer and M. L. Kapsenberg, "Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype," *Blood*, vol. 90, no. 5, pp. 1920-1926, 1997.
- [143] E. Guenova, T. Volz, K. Sauer, S. Kaesler, M. R. Muller, F. Wolbing, K. Chen, C. Schwarzler, P. Brossart, M. Rocken and T. Biedermann, "IL-4-mediated fine tuning of IL-12p70 production by human DC," *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, no. 11, pp. 3138-3149, 2008.
- [144] L. Frasca, M. Nasso, F. Spensieri, G. Fedele, R. Palazzo, F. Malavasi and C. M. Ausiello, "IFN-gamma arms human dendritic cells to perform multiple effector functions," *J. Immunol.*, vol. 180, no. 3, pp. 1471-1481, 2008.
- [145] L. P. Cousens, J. S. Orange, H. C. Su and C. A. Biron, "Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 94, no. 2, pp. 634-639, 1997.
- [146] F. Ria, G. Penna and L. Adorini, "Th1 cells induce and Th2 inhibit antigen-dependent IL-12 secretion by dendritic cells," *Eur. J. Immunol.*, vol. 28, no. 6, pp. 2003-2016, 1998.
- [147] M. Rimoldi, M. Chieppa, V. Salucci, F. Avogadri, A. Sonzogni, G. M. Sampietro, A. Nespoli, G. Viale, P. Allavena and M. Rescigno, "Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells," *Nat. Immunol.*, vol. 6, no. 5, pp. 507-514, 2005.
- [148] R. E. Roses, S. Xu, M. Xu, U. Koldovsky, G. Koski and B. J. Czerniecki, "Differential production of IL-23 and IL-12 by myeloid-derived dendritic cells in response to TLR agonists," *J. Immunol.*, vol. 181, no. 7, pp. 5120-5127, 2008.
- [149] B. Oppmann, R. Lesley, B. Blom, J. C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J. S. Abrams, K. W. Moore, D. Rennick, R. d. Waal-Malefyt, C. Hannum, J. F. Bazan and R. A. Kastelein, "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12," *Immunity*, vol. 13, no. 5, pp. 715-725, 2000.
- [150] T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo, "IL-17 and Th17 Cells," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, pp. 485-517, 2009.
- [151] M. J. McGeachy, K. S. Bak-Jensen, Y. Chen, C. M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan and D. J. Cua, "TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology," *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 12, pp. 1390-1397, 2007.
- [152] K. Steinbrink, M. Wolf, H. Jonuleit, J. Knop and A. H. Enk, "Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells," *J. Immunol.*, vol. 159, no. 10, pp. 4772-4780, 1997.
- [153] P. Kalinski, C. M. Hilkens, E. A. Wierenga and M. L. Kapsenberg, "T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal," *Immunol. Today*, vol. 20, no. 12, pp. 561-567, 1999.
- [154] T. R. Mempel, S. E. Henrickson and U. H. Von, "T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases," *Nature*, vol. 427, pp. 154-159, 2004.
- [155] M. K. Jenkins, A. Khoruts, E. Ingulli, D. L. Mueller, S. J. McSorley, R. L. Reinhardt, A. Itano and K. A. Pape, "In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 19, pp. 23-45, 2001.

- [156] E. S. Baekkevold, T. Yamanaka, R. T. Palframan, H. S. Carlsen, F. P. Reinholt, U. H. von, P. Brandtzaeg and G. Haraldsen, "The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment," *J. Exp. Med.*, vol. 193, no. 9, pp. 1105-1112, 2001.
- [157] P. Bousso and E. Robey, "Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes," *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 6, pp. 579-585, 2003.
- [158] E. Ingulli, A. Mondino, A. Khoruts and M. K. Jenkins, "In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells," *J. Exp. Med.*, vol. 185, no. 12, pp. 2133-2141, 1997.
- [159] G. A. Koretzky, "Multiple roles of CD4 and CD8 in T cell activation," *J. Immunol.*, vol. 185, no. 5, pp. 2643-2644, 2010.
- [160] A. Lanzavecchia and F. Sallusto, "Regulation of T cell immunity by dendritic cells," *Cell*, vol. 106, no. 3, pp. 263-266, 2001.
- [161] M. F. Bachmann and A. Oxenius, "Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again," *EMBO Rep.*, vol. 8, no. 12, pp. 1142-1148, 2007.
- [162] M. Frentsch, O. Arbach, D. Kirchhoff, B. Moewes, M. Worm, M. Rothe, A. Scheffold and A. Thiel, "Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression," *Nat. Med.*, vol. 11, no. 10, pp. 1118-1124, 2005.
- [163] T. Luft, E. Maraskovsky, M. Schnurr, K. Knebel, M. Kirsch, M. Gorner, R. Skoda, A. D. Ho, P. Nawroth and A. Bierhaus, "Tuning the volume of the immune response: strength and persistence of stimulation determine migration and cytokine secretion of dendritic cells," *Blood*, vol. 104, no. 4, pp. 1066-1074, 2004.
- [164] T. Ito, Y. H. Wang, O. Duramad, T. Hori, G. J. Delespesse, N. Watanabe, F. X. Qin, Z. Yao, W. Cao and Y. J. Liu, "TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand," *J. Exp. Med.*, vol. 202, no. 9, pp. 1213-1223, 2005.
- [165] Y. Ohshima, L. P. Yang, T. Uchiyama, Y. Tanaka, P. Baum, M. Sergerie, P. Hermann and G. Delespesse, "OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4(+) T cells into high IL-4-producing effectors," *Blood*, vol. 92, no. 9, pp. 3338-3345, 1998.
- [166] L. Liu, B. E. Rich, J. Inobe, W. Chen and H. L. Weiner, "Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4," *Int. Immunol.*, vol. 10, no. 8, pp. 1017-1026, 1998.
- [167] L. E. Harrington, R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver, "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages," *Nat. Immunol.*, vol. 6, no. 11, pp. 1123-1132, 2005.
- [168] N. J. Wilson, K. Boniface, J. R. Chan, B. S. McKenzie, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, J. C. Lecron, R. A. Kastelein, D. J. Cua, T. K. McClanahan, E. P. Bowman and R. d. Waal, "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells," *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 9, pp. 950-957, 2007.
- [169] E. V. Acosta-Rodriguez, G. Napolitani, A. Lanzavecchia and F. Sallusto, "Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells," *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 9, pp. 942-949, 2007.
- [170] F. Gerosa, B. Baldani-Guerra, L. A. Lyakh, G. Batoni, S. Esin, R. T. Winkler-Pickett, M. R. Consolaro, M. D. Marchi, D. Giachino, A. Robbiano, M. Astegiano, A. Sambataro, R. A. Kastelein, G. Carra and G. Trinchieri, "Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 6, pp. 1447-1461, 2008.

- [171] M. K. Levings, S. Gregori, E. Tresoldi, S. Cazzaniga, C. Bonini and M. G. Roncarolo, "Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells," *Blood*, vol. 105, no. 3, pp. 1162-1169, 2005.
- [172] M. V. Dhodapkar, R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz and N. Bhardwaj, "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells," *J. Exp. Med.*, vol. 193, no. 2, pp. 233-238, 2001.
- [173] P. Kalinski, J. H. Schuitemaker, C. M. Hilkens, E. A. Wierenga and M. L. Kapsenberg, "Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells," *J. Immunol.*, vol. 162, no. 6, pp. 3231-3236, 1999.
- [174] E. P. Rieber and A. Roers, "Grundlagen der Immunologie für Studierende der Medizin und der Biologie," Skriptum, TU Dresden, 2010.
- [175] F. Sallusto, D. Lenig, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia, "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions," *Nature*, vol. 401, pp. 708-712, 1999.
- [176] W. W. Agace, "Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, no. 9, pp. 682-692, 2006.
- [177] D. J. Campbell and E. C. Butcher, "Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues," *J. Exp. Med.*, vol. 195, no. 1, pp. 135-141, 2002.
- [178] J. J. Campbell, G. Haraldsen, J. Pan, J. Rottman, S. Qin, P. Ponath, D. P. Andrew, R. Warnke, N. Ruffing, N. Kassam, L. Wu and E. C. Butcher, "The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells," *Nature*, vol. 400, no. 6746, pp. 776-780, 1999.
- [179] B. Homey, H. Alenius, A. Muller, H. Soto, E. P. Bowman, W. Yuan, L. McEvoy, A. I. Lauerma, T. Assmann, E. Bunemann, M. Lehto, H. Wolff, D. Yen, H. Marxhausen, W. To, J. Sedgwick, T. Ruzicka, P. Lehmann and A. Zlotnik, "CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation," *Nat. Med.*, vol. 8, no. 2, pp. 157-165, 2002.
- [180] H. Sigmundsdottir and E. C. Butcher, "Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking," *Nat. Immunol.*, vol. 9, no. 9, pp. 981-987, 2008.
- [181] J. R. Mora, M. R. Bono, N. Manjunath, W. Weninger, L. L. Cavanagh, M. Roseblatt and U. H. Von, "Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells," *Nature*, vol. 424, no. 6944, pp. 88-93, 2003.
- [182] E. J. Kunkel, J. J. Campbell, G. Haraldsen, J. Pan, J. Boisvert, A. I. Roberts, E. C. Ebert, M. A. Vierra, S. B. Goodman, M. C. Genovese, A. J. Wardlaw, H. B. Greenberg, C. M. Parker, E. C. Butcher, D. P. Andrew and W. W. Agace, "Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity," *J. Exp. Med.*, vol. 192, no. 5, pp. 761-768, 2000.
- [183] M. Iwata, A. Hirakiyama, Y. Eshima, H. Kagechika, C. Kato and S. Y. Song, "Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells," *Immunity*, vol. 21, no. 4, pp. 527-538, 2004.
- [184] F. Sallusto and A. Lanzavecchia, "Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity," *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, no. 8, pp. 2076-2082, 2009.
- [185] M. G. Bonecini-Almeida, S. Chitale, I. Boutsikakis, J. Geng, H. Doo, S. He and J. L. Ho, "Induction of in vitro human macrophage anti-Mycobacterium tuberculosis activity: requirement for IFN-gamma and primed lymphocytes," *J. Immunol.*, vol. 160, no. 9, pp. 4490-4499, 1998.
- [186] K. Schroder, P. J. Hertzog, T. Ravasi and D. A. Hume, "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 75, no. 2, pp. 163-189, 2004.

- [187] E. V. Acosta-Rodriguez, L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto and G. Napolitani, "Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells," *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 6, pp. 639-646, 2007.
- [188] W. Ouyang, J. K. Kolls and Y. Zheng, "The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation," *Immunity*, vol. 28, no. 4, pp. 454-467, 2008.
- [189] F. Annunziato, L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi and S. Romagnani, "Phenotypic and functional features of human Th17 cells," *J. Exp. Med.*, vol. 204, no. 8, pp. 1849-1861, 2007.
- [190] M. Messi, I. Giacchetto, K. Nagata, A. Lanzavecchia, G. Natoli and F. Sallusto, "Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes," *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 1, pp. 78-86, 2003.
- [191] Y. Y. Wan, "Multi-tasking of helper T cells," *Immunology*, vol. 130, no. 2, pp. 166-171, 2010.
- [192] M. Assenmacher, M. Lohning, A. Scheffold, R. A. Manz, J. Schmitz and A. Radbruch, "Sequential production of IL-2, IFN-gamma and IL-10 by individual staphylococcal enterotoxin B-activated T helper lymphocytes," *Eur. J. Immunol.*, vol. 28, no. 5, pp. 1534-1543, 1998.
- [193] S. Koch, A. Larbi, E. Derhovanessian, D. Ozelik, E. Naumova and G. Pawelec, "Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people," *Immun Ageing*, vol. 5, p. 6, 2008.
- [194] S. Kohler and A. Thiel, "Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets," *Blood*, vol. 113, pp. 769-774, 2009.
- [195] A. Thiel, T. Alexander, C. A. Schmidt, G. K. Przybylski, S. Kimmig, S. Kohler, H. Radtke, E. Gromnica-Ihle, G. Massenkeil, A. Radbruch, R. Arnold and F. Hiepe, "Direct assessment of thymic reactivation after autologous stem cell transplantation," *Acta Haematol.*, vol. 119, no. 1, pp. 22-27, 2008.
- [196] I. den Braber, T. Mugwagwa, N. Vrisekoop, L. Westera, R. Mogling, A. B. de, N. Willems, E. H. Schrijver, G. Spierenburg, K. Gaiser, E. Mul, S. A. Otto, A. F. Ruiters, M. T. Ackermans, F. Miedema, J. A. Borghans, R. J. de and K. Tesselaar, "Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans," *Immunity*, vol. 36, no. 2, pp. 288-297, 2012.
- [197] R. D. Kilpatrick, T. Rickabaugh, L. E. Hultin, P. Hultin, M. A. Hausner, R. Detels, J. Phair and B. D. Jamieson, "Homeostasis of the naive CD4+ T cell compartment during aging," *J. Immunol.*, vol. 180, no. 3, pp. 1499-1507, 2008.
- [198] P. J. Fink and D. W. Hendricks, "Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 8, pp. 544-549, 2011.
- [199] S. Kimmig, G. K. Przybylski, C. A. Schmidt, K. Laurisch, B. Mowes, A. Radbruch and A. Thiel, "Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood," *J. Exp. Med.*, vol. 195, pp. 789-794, 2002.
- [200] S. Kohler, U. Wagner, M. Pierer, S. Kimmig, B. Oppmann, B. Mowes, K. Julke, C. Romagnani and A. Thiel, "Post-thymic in vivo proliferation of naive CD4+ T cells constrains the TCR repertoire in healthy human adults," *Eur. J. Immunol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1987-1994, 2005.
- [201] S. Sakaguchi, M. Miyara, C. M. Costantino and D. A. Hafler, "FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 7, pp. 490-500, 2010.
- [202] S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura and M. Ono, "Regulatory T cells and immune tolerance," *Cell*, vol. 133, no. 5, pp. 775-787, 2008.
- [203] R. K. Gershon and K. Kondo, "Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes," *Immunology*, vol. 18, no. 5, pp. 723-737, 1970.

- [204] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda, "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases," *J. Immunol.*, vol. 155, no. 3, pp. 1151-1164, 1995.
- [205] C. Baecher-Allan, J. A. Brown, G. J. Freeman and D. A. Hafler, "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood," *J. Immunol.*, vol. 167, no. 3, pp. 1245-1253, 2001.
- [206] H. Yagi, T. Nomura, K. Nakamura, S. Yamazaki, T. Kitawaki, S. Hori, M. Maeda, M. Onodera, T. Uchiyama, S. Fujii and S. Sakaguchi, "Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells," *Int. Immunol.*, vol. 16, no. 11, pp. 1643-1656, 2004.
- [207] S. Hori, T. Nomura and S. Sakaguchi, "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3," *Science*, vol. 299, pp. 1057-1061, 2003.
- [208] J. Fontenot, M. Gavin and A. Y. Rudensky, "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells," *Nat. Immunol.*, vol. 4(4), pp. 330-336, March 2003.
- [209] C. L. Bennett, J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance and H. D. Ochs, "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3," *Nat. Genet.*, vol. 27, no. 1, pp. 20-21, 2001.
- [210] C. S. Lages, I. Suffia, P. A. Velilla, B. Huang, G. Warshaw, D. A. Hildeman, Y. Belkaid and C. Chougnat, "Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation," *J. Immunol.*, vol. 181, pp. 1835-1848, 2008.
- [211] N. Watanabe, Y. H. Wang, H. K. Lee, T. Ito, Y. H. Wang, W. Cao and Y. J. Liu, "Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus," *Nature*, vol. 436, no. 7054, pp. 1181-1185, 2005.
- [212] W. Fujimaki, N. Takahashi, K. Ohnuma, M. Nagatsu, H. Kurosawa, S. Yoshida, N. H. Dang, T. Uchiyama and C. Morimoto, "Comparative study of regulatory T cell function of human CD25CD4 T cells from thymocytes, cord blood, and adult peripheral blood," *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2008, p. 305859, 2008.
- [213] M. Miyara, Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taflin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z. Amoura, G. Gorochov and S. Sakaguchi, "Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor," *Immunity*, vol. 30, no. 6, pp. 899-911, 2009.
- [214] N. J. Booth, A. J. McQuaid, T. Sobande, S. Kissane, E. Agius, S. E. Jackson, M. Salmon, F. Falciani, K. Yong, M. H. Rustin, A. N. Akbar and M. Vukmanovic-Stejic, "Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4+ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO," *J. Immunol.*, vol. 184, no. 8, pp. 4317-4326, 2010.
- [215] M. Vukmanovic-Stejic, Y. Zhang, J. E. Cook, J. M. Fletcher, A. McQuaid, J. E. Masters, M. H. Rustin, L. S. Taams, P. C. Beverley, D. C. Macallan and A. N. Akbar, "Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo," *J. Clin. Invest.*, vol. 116, pp. 2423-2433, 2006.
- [216] J. L. Coombes, K. R. Siddiqui, C. V. Arancibia-Carcamo, J. Hall, C. M. Sun, Y. Belkaid and F. Powrie, "A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism," *J. Exp. Med.*, vol. 204, pp. 1757-1764, 2007.
- [217] D. Mucida, N. Kutchukhidze, A. Erazo, M. Russo, J. J. Lafaille and M. A. Curotto, "Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs," *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 7, pp. 1923-1933, 2005.

- [218] C. M. Sun, J. A. Hall, R. B. Blank, N. Bouladoux, M. Oukka, J. R. Mora and Y. Belkaid, "Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid," *J. Exp. Med.*, vol. 204, no. 8, pp. 1775-1785, 2007.
- [219] A. M. Thornton and E. M. Shevach, "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific," *J. Immunol.*, vol. 164, pp. 183-190, 2000.
- [220] M. Vukmanovic-Stejic, E. Agius, N. Booth, P. J. Dunne, K. E. Lacy, J. R. Reed, T. O. Sobande, S. Kissane, M. Salmon, M. H. Rustin and A. N. Akbar, "The kinetics of CD4+Foxp3+ T cell accumulation during a human cutaneous antigen-specific memory response in vivo," *J. Clin. Invest.*, vol. 118, pp. 3639-3650, 2008.
- [221] W. Chen, W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady and S. M. Wahl, "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3," *J. Exp. Med.*, vol. 198, no. 12, pp. 1875-1886, 2003.
- [222] B. Knoechel, J. Lohr, E. Kahn, J. A. Bluestone and A. K. Abbas, "Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen," *J. Exp. Med.*, vol. 202, pp. 1375-1386, 2005.
- [223] S. Yamagiwa, J. D. Gray, S. Hashimoto and D. A. Horwitz, "A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood," *J. Immunol.*, vol. 166, pp. 7282-7289, 2001.
- [224] S. G. Zheng, J. H. Wang, J. D. Gray, H. Soucier and D. A. Horwitz, "Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10," *J. Immunol.*, vol. 172, no. 9, pp. 5213-5221, 2004.
- [225] M. A. Curotto de Lafaille and J. J. Lafaille, "Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?," *Immunity*, vol. 30, no. 5, pp. 626-635, 2009.
- [226] S. E. Allan, S. Q. Crome, N. K. Crellin, L. Passerini, T. S. Steiner, R. Bacchetta, M. G. Roncarolo and M. K. Levings, "Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production," *Int. Immunol.*, vol. 19, no. 4, pp. 345-354, 2007.
- [227] U. Baron, S. Floess, G. Wieczorek, K. Baumann, A. Grutzkau, J. Dong, A. Thiel, T. J. Boeld, P. Hoffmann, M. Edinger, I. Turbachova, A. Hamann, S. Olek and J. Huehn, "DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells," *Eur. J. Immunol.*, vol. 37, no. 9, pp. 2378-2389, 2007.
- [228] M. G. Roncarolo, M. K. Levings and C. Traversari, "Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells," *J. Exp. Med.*, vol. 193, no. 2, pp. 5-9, 2001.
- [229] H. L. Weiner, "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells," *Immunol. Rev.*, vol. 182, pp. 207-214, 2001.
- [230] C. E. Tadokoro, G. Shakhar, S. Shen, Y. Ding, A. C. Lino, A. Maraver, J. J. Lafaille and M. L. Dustin, "Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo," *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 3, pp. 505-511, 2006.
- [231] Y. Onishi, Z. Fehervari, T. Yamaguchi and S. Sakaguchi, "Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 105, pp. 10113-10118, 2008.
- [232] N. Misra, J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine and S. V. Kaveri, "Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells," *J. Immunol.*, vol. 172, no. 8, pp. 4676-4680, 2004.
- [233] M. M. Tiemessen, A. L. Jagger, H. G. Evans, M. J. van, S. John and L. S. Taams, "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 104, pp. 19446-19451, 2007.

- [234] P. Pandiyan, L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed and M. J. Lenardo, "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells," *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 12, pp. 1353-1362, 2007.
- [235] Y. Vercoulen, E. J. Wehrens, N. H. van, W. d. Jager, J. M. Beekman and B. J. Prakken, "Human regulatory T cell suppressive function is independent of apoptosis induction in activated effector T cells," *PLoS ONE*, vol. 4, no. 9, p. e7183, 2009.
- [236] F. Venet, A. Pachot, A. L. Debard, J. Bohe, J. Bienvenu, A. Lepape, W. S. Powell and G. Monneret, "Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism," *J. Immunol.*, vol. 177, no. 9, pp. 6540-6547, 2006.
- [237] L. Strauss, C. Bergmann and T. L. Whiteside, "Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis," *J. Immunol.*, vol. 182, no. 3, pp. 1469-1480, 2009.
- [238] W. J. Grossman, J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson and T. J. Ley, "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death," *Immunity*, vol. 21, no. 4, pp. 589-601, 2004.
- [239] K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura and S. Sakaguchi, "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function," *Science*, vol. 322, pp. 271-275, 2008.
- [240] C. Oderup, L. Cederbom, A. Makowska, C. M. Cilio and F. Ivars, "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression," *Immunology*, vol. 118, pp. 240-249, 2006.
- [241] F. Fallarino, U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre and P. Puccetti, "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells," *Nat. Immunol.*, vol. 4, pp. 1206-1212, 2003.
- [242] D. H. Munn, M. D. Sharma and A. L. Mellor, "Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells," *J. Immunol.*, vol. 172, no. 7, pp. 4100-4110, 2004.
- [243] C. N. Manzotti, H. Tipping, L. C. Perry, K. I. Mead, P. J. Blair, Y. Zheng and D. M. Sansom, "Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25+ regulatory T cells," *Eur. J. Immunol.*, vol. 32, no. 10, pp. 2888-2896, 2002.
- [244] F. Di Virgilio, "Purinergic signalling in the immune system. A brief update," *Purinergic Signal.*, vol. 3, no. 1-2, pp. 1-3, 2007.
- [245] K. Atarashi, J. Nishimura, T. Shima, Y. Umesaki, M. Yamamoto, M. Onoue, H. Yagita, N. Ishii, R. Evans, K. Honda and K. Takeda, "ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation," *Nature*, vol. 455, no. 7214, pp. 808-812, 2008.
- [246] M. Thiel, C. C. Caldwell and M. V. Sitkovsky, "The critical role of adenosine A2A receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases," *Microbes Infect.*, vol. 5, no. 6, pp. 515-526, 2003.
- [247] G. Borsellino, M. Kleinewietfeld, D. D. Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Hopner, D. Centonze, G. Bernardi, M. L. Dell'Acqua, P. M. Rossini, L. Battistini, O. Rotzschke and K. Falk, "Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression," *Blood*, vol. 110, pp. 1225-1232, 2007.
- [248] S. Deaglio, K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom and S. C. Robson, "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression," *J. Exp. Med.*, vol. 204, no. 6, pp. 1257-1265, 2007.

- [249] J. J. Kobie, P. R. Shah, L. Yang, J. A. Rebhahn, D. J. Fowell and T. R. Mosmann, "T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine," *J. Immunol.*, vol. 177, no. 10, pp. 6780-6786, 2006.
- [250] E. Panther, S. Corinti, M. Idzko, Y. Herouy, M. Napp, A. I. Sala, G. Girolomoni and J. Norgauer, "Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells," *Blood*, vol. 101, no. 10, pp. 3985-3990, 2003.
- [251] B. Knoechel, J. Lohr, S. Zhu, L. Wong, D. Hu, L. Ausubel and A. K. Abbas, "Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes," *J. Immunol.*, vol. 176, no. 11, pp. 6473-6483, 2006.
- [252] J. Savill, I. Dransfield, C. Gregory and C. Haslett, "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 12, pp. 965-975, 2002.
- [253] C. von Pirquet, "Das Verhalten der kutanen Tuberkulinreaktion während der Masern," *Dtsch med Wochenschr*, vol. 34(30), pp. 1297-1300, 1908.
- [254] R. H. Schwartz, "T cell anergy," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 21, pp. 305-334, 2003.
- [255] A. V. Gett, F. Sallusto, A. Lanzavecchia and J. Geginat, "T cell fitness determined by signal strength," *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 4, pp. 355-360, 2003.
- [256] L. L. Carter, L. A. Fouser, J. Jussif, L. Fitz, B. Deng, C. R. Wood, M. Collins, T. Honjo, G. J. Freeman and B. M. Carreno, "PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2," *Eur. J. Immunol.*, vol. 32, no. 3, pp. 634-643, 2002.
- [257] S. Sadegh-Nasseri, S. K. Dalai, L. C. Korb and S. Mirshahidi, "Suboptimal engagement of the T-cell receptor by a variety of peptide-MHC ligands triggers T-cell anergy," *Immunology*, vol. 129, no. 1, pp. 1-7, 2010.
- [258] H. Groux, M. Bigler, J. E. de and M. G. Roncarolo, "Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells," *J. Exp. Med.*, vol. 184, no. 1, pp. 19-29, 1996.
- [259] S. Perruche, P. Zhang, Y. Liu, P. Saas, J. A. Bluestone and W. Chen, "CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells," *Nat. Med.*, vol. 14, no. 5, pp. 528-535, 2008.
- [260] G. Nocentini, L. Giunchi, S. Ronchetti, L. T. Krausz, A. Bartoli, R. Moraca, G. Migliorati and C. Riccardi, "A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 94, pp. 6216-6221, 1997.
- [261] F. Kanamaru, P. Youngnak, M. Hashiguchi, T. Nishioka, T. Takahashi, S. Sakaguchi, I. Ishikawa and M. Azuma, "Costimulation via glucocorticoid-induced TNF receptor in both conventional and CD25+ regulatory CD4+ T cells," *J. Immunol.*, vol. 172, pp. 7306-7314, 2004.
- [262] E. M. Shevach and G. L. Stephens, "The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity?," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, no. 8, pp. 613-618, 2006.
- [263] G. L. Stephens, R. S. McHugh, M. J. Whitters, D. A. Young, D. Luxenberg, B. M. Carreno, M. Collins and E. M. Shevach, "Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells," *J. Immunol.*, vol. 173, pp. 5008-5020, 2004.
- [264] R. S. McHugh, M. J. Whitters, C. A. Piccirillo, D. A. Young, E. M. Shevach, M. Collins and M. C. Byrne, "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor," *Immunity*, vol. 16, no. 2, pp. 311-323, 2002.
- [265] H. T. Jin, Y. H. Jeong, H. J. Park and S. J. Ha, "Mechanism of T cell exhaustion in a chronic environment," *BMB Rep*, vol. 44, no. 4, pp. 217-231, 2011.

- [266] P. Marrack and J. Kappler, "Control of T cell viability," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 22, pp. 765-787, 2004.
- [267] A. Krueger, S. C. Fas, S. Baumann and P. H. Krammer, "The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis," *Immunol. Rev.*, vol. 193, pp. 58-69, 2003.
- [268] M. F. Krummel and J. P. Allison, "CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells," *J. Exp. Med.*, vol. 183, pp. 2533-2540, 1996.
- [269] M. Ramaswamy, A. C. Cruz, S. Y. Cleland, M. Deng, S. Price, V. K. Rao and R. M. Siegel, "Specific elimination of effector memory CD4+ T cells due to enhanced Fas signaling complex formation and association with lipid raft microdomains," *Cell Death Differ.*, vol. 18, no. 4, pp. 712-720, 2011.
- [270] B. T. Fife and J. A. Bluestone, "Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways," *Immunol. Rev.*, vol. 224, pp. 166-182, 2008.
- [271] D. R. Green, N. Droin and M. Pinkoski, "Activation-induced cell death in T cells," *Immunol. Rev.*, vol. 193, pp. 70-81, 2003.
- [272] T. Lehner, "Special regulatory T cell review: The resurgence of the concept of contrasuppression in immunoregulation," *Immunology*, vol. 123, pp. 40-44, 2008.
- [273] Y. E. Latchman, S. C. Liang, Y. Wu, T. Chernova, R. A. Sobel, M. Klemm, V. K. Kuchroo, G. J. Freeman and A. H. Sharpe, "PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 101, pp. 10691-10696, 2004.
- [274] S. C. Liang, Y. E. Latchman, J. E. Buhlmann, M. F. Tomczak, B. H. Horwitz, G. J. Freeman and A. H. Sharpe, "Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses," *Eur. J. Immunol.*, vol. 33, no. 10, pp. 2706-2716, 2003.
- [275] M. E. Keir, L. M. Francisco and A. H. Sharpe, "PD-1 and its ligands in T-cell immunity," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 19, pp. 309-314, 2007.
- [276] T. Brunner, R. J. Mogil, D. LaFace, N. J. Yoo, A. Mahboubi, F. Echeverri, S. J. Martin, W. R. Force, D. H. Lynch and C. F. Ware, "Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas," *Nature*, vol. 373, no. 6513, pp. 441-444, 1995.
- [277] M. J. Pinkoski and D. R. Green, "Apoptosis in the regulation of immune responses," *J Rheumatol Suppl*, vol. 74, pp. 19-25, 2005.
- [278] M. L. Hermiston, Z. Xu and A. Weiss, "CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 21, pp. 107-137, 2003.
- [279] D. E. Jackson, "The unfolding tale of PECAM-1," *FEBS Lett.*, vol. 540, no. 1-3, pp. 7-14, 2003.
- [280] N. Wagner, J. Lohler, E. J. Kunkel, K. Ley, E. Leung, G. Krissansen, K. Rajewsky and W. Muller, "Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue," *Nature*, vol. 382, no. 6589, pp. 366-370, 1996.
- [281] R. Testi, J. H. Phillips and L. L. Lanier, "T cell activation via Leu-23 (CD69)," *J. Immunol.*, vol. 143, no. 4, pp. 1123-1128, 1989.
- [282] D. Sancho, M. Gomez and F. Sanchez-Madrid, "CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation," *Trends Immunol.*, vol. 26, no. 3, pp. 136-140, 2005.
- [283] V. A. Boussiotis, E. Y. Tsai, E. J. Yunis, S. Thim, J. C. Delgado, C. C. Dascher, A. Berezovskaya, D. Rousset, J. M. Reynes and A. E. Goldfeld, "IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients," *J. Clin. Invest.*, vol. 105, no. 9, pp. 1317-1325, 2000.

- [284] P. McGuirk, C. McCann and K. H. Mills, "Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*," *J. Exp. Med.*, vol. 195, no. 2, pp. 221-231, 2002.
- [285] C. L. Day, D. E. Kaufmann, P. Kiepiela, J. A. Brown, E. S. Moodley, S. Reddy, E. W. Mackey, J. D. Miller, A. J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E. J. Wherry, H. M. Coovadia, P. J. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G. J. Freeman and B. D. Walker, "PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression," *Nature*, vol. 443, pp. 350-354, 2006.
- [286] M. Walther, J. E. Tongren, L. Andrews, D. Korbel, E. King, H. Fletcher, R. F. Andersen, P. Bejon, F. Thompson, S. J. Dunachie, F. Edele, J. B. de, R. E. Sinden, S. C. Gilbert, E. M. Riley and A. V. Hill, "Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection," *Immunity*, vol. 23, no. 3, pp. 287-296, 2005.
- [287] V. Moos and T. Schneider, "Changing paradigms in Whipple's disease and infection with *Tropheryma whippelii*," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 30, no. 10, pp. 1151-1158, 2011.
- [288] M. Maiwald, F. Schuhmacher, H. J. Ditton and A. v. Herbay, "Environmental occurrence of the Whipple's disease bacterium (*Tropheryma whippelii*)," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no. 2, pp. 760-762, 1998.
- [289] T. Schneider, V. Moos, C. Loddenkemper, T. Marth, F. Fenollar and D. Raoult, "Whipple's disease: new aspects of pathogenesis and treatment," *Lancet Infect Dis*, vol. 8, pp. 179-190, 2008.
- [290] J. C. Lagier, H. Lepidi, D. Raoult and F. Fenollar, "Systemic *Tropheryma whippelii*: clinical presentation of 142 patients with infections diagnosed or confirmed in a reference center," *Medicine (Baltimore)*, vol. 89, no. 5, pp. 337-345, 2010.
- [291] G. H. Whipple, "A hitherto undescribed disease characterized anatomically by deposits of fat and fatty acids in the intestinal and mesenteric lymph node tissues.," *Bull Johns Hopkins Hosp*, vol. 18, pp. 382-91, 1907.
- [292] W. C. Chears and C. T. Ashworth, "Electron microscopic study of the intestinal mucosa in Whipple's disease. Demonstration of encapsulated bacilliform bodies in the lesion," *Gastroenterology*, vol. 41, pp. 129-138, 1961.
- [293] J. H. Yardley and T. R. Hendrix, "Combined electron and light microscopy in Whipple's disease. Demonstration of "bacillary bodies" in the intestine," *Bull Johns Hopkins Hosp*, vol. 109, pp. 80-98, 1961.
- [294] K. H. Wilson, R. Blitchington, R. Frothingham and J. A. Wilson, "Phylogeny of the Whipple's-disease-associated bacterium," *Lancet*, vol. 338, no. 8765, pp. 474-475, 1991.
- [295] D. A. Relman, T. M. Schmidt, R. P. MacDermott and S. Falkow, "Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 327, no. 5, pp. 293-301, 1992.
- [296] D. Raoult, M. L. Birg, B. L. Scola, P. E. Fournier, M. Enea, H. Lepidi, V. Roux, J. C. Piette, F. Vandenesch, D. Vital-Durand and T. J. Marrie, "Cultivation of the bacillus of Whipple's disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 342, pp. 620-625, 2000.
- [297] B. La Scola, F. Fenollar, P. E. Fournier, M. Altwegg, M. N. Mallet and D. Raoult, "Description of *Tropheryma whippelii* gen. nov., sp. nov., the Whipple's disease bacillus," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 51, pp. 1471-1479, 2001.
- [298] B. L. Baisden, H. Lepidi, D. Raoult, P. Argani, J. H. Yardley and J. S. Dumler, "Diagnosis of Whipple disease by immunohistochemical analysis: a sensitive and specific method for the detection of *Tropheryma whippelii* (the Whipple bacillus) in paraffin-embedded tissue," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 118, no. 5, pp. 742-748, 2002.

- [299] T. Schneider and M. Zeitz, "Krankheits- und Immunphänomene bei Morbus Whipple. Differentialdiagnose zu rheumatischen Erkrankungen," *Internist (Berl)*, vol. 44, no. 2, pp. 184-190, 2003.
- [300] J. D. O'Duffy, W. L. Griffing, C. Y. Li, M. F. Abdelmalek and D. H. Persing, "Whipple's arthritis: direct detection of *Tropheryma whippelii* in synovial fluid and tissue," *Arthritis Rheum.*, vol. 42, no. 4, pp. 812-817, 1999.
- [301] F. Fenollar, X. Puechal and D. Raoult, "Whipple's disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 356, no. 1, pp. 55-66, 2007.
- [302] A. Gerard, F. Sarrot-Reynauld, E. Liozon, P. Cathebras, G. Besson, C. Robin, A. Vighetto, J. F. Mosnier, I. Durieu, D. V. Durand and H. Rousset, "Neurologic presentation of Whipple disease: report of 12 cases and review of the literature," *Medicine (Baltimore)*, vol. 81, no. 6, pp. 443-457, 2002.
- [303] H. Lepidi, F. Fenollar, J. S. Dumler, V. Gauduchon, L. Chalabreysse, A. Bammert, M. F. Bonzi, F. Thivolet-Bejui, F. Vandenesch and D. Raoult, "Cardiac valves in patients with Whipple endocarditis: microbiological, molecular, quantitative histologic, and immunohistochemical studies of 5 patients," *J. Infect. Dis.*, vol. 190, no. 5, pp. 935-945, 2004.
- [304] W. Geissdorfer, V. Moos, A. Moter, C. Loddenkemper, A. Jansen, R. Tandler, A. J. Morguet, F. Fenollar, D. Raoult, C. Bogdan and T. Schneider, "High frequency of *Tropheryma whippelii* in culture-negative endocarditis," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, no. 2, pp. 216-222, 2012.
- [305] D. D. Dykman, B. A. Cuccherini, I. J. Fuss, L. W. Blum, J. E. Woodward and W. Strober, "Whipple's disease in a father-daughter pair," *Dig. Dis. Sci.*, vol. 44, no. 12, pp. 2542-2544, 1999.
- [306] J. B. Gross, E. E. Wollaeger, W. G. Sauer, K. A. Huizenga, D. C. Dahlin and M. H. Power, "Whipple's disease; report of four cases, including two in brothers, with observations on pathologic physiology, diagnosis, and treatment," *Gastroenterology*, vol. 36, no. 1, pp. 65-93, 1959.
- [307] M. Martinetti, F. Biagi, C. Badulli, G. E. Feurle, C. Muller, V. Moos, T. Schneider, T. Marth, A. Marchese, L. Trotta, S. Sachetto, A. Pasi, A. D. Silvestri, L. Salvaneschi and G. R. Corazza, "The HLA alleles DRB1*13 and DQB1*06 are associated to Whipple's disease," *Gastroenterology*, vol. 136, pp. 2289-2294, 2009.
- [308] B. Black-Schaffer, "The tinctoral demonstration of a glycoprotein in Whipple's disease," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol. 72, no. 1, pp. 225-227, 1949.
- [309] D. N. Fredricks and D. A. Relman, "Localization of *Tropheryma whippelii* rRNA in tissues from patients with Whipple's disease," *J. Infect. Dis.*, vol. 183, no. 8, pp. 1229-1237, 2001.
- [310] M. T. Silva, P. M. Macedo and J. F. Moura, "Ultrastructure of bacilli and the bacillary origin of the macrophagic inclusions in Whipple's disease," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 131, no. 5, pp. 1001-1013, 1985.
- [311] C. J. Bonhomme, P. Renesto, S. Nandi, A. M. Lynn and D. Raoult, "Serological microarray for a paradoxical diagnostic of Whipple's disease," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 27, pp. 959-968, 2008.
- [312] J. W. Paulley, "A case of Whipple's disease (intestinal lipodystrophy)," *Gastroenterology*, vol. 22, no. 1, pp. 128-133, 1952.
- [313] G. E. Feurle, V. Moos, K. Schinnerling, A. Geelhaar, K. Allers, F. Biagi, H. Blaker, A. Moter, C. Loddenkemper, A. Jansen and T. Schneider, "The Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in Whipple Disease: A Cohort Study," *Ann. Intern. Med.*, vol. 153, no. 11, pp. 710-717, 2010.

- [314] S. D. Bentley, M. Maiwald, L. D. Murphy, M. J. Pallen, C. A. Yeats, L. G. Dover, H. T. Norbertczak, G. S. Besra, M. A. Quail, D. E. Harris, A. v. Herbay, A. Goble, S. Rutter, R. Squares, S. Squares, B. G. Barrell, J. Parkhill and D. A. Relman, "Sequencing and analysis of the genome of the Whipple's disease bacterium *Tropheryma whippelii*," *Lancet*, vol. 361, no. 9358, pp. 637-644, 2003.
- [315] D. Raoult, H. Ogata, S. Audic, C. Robert, K. Suhre, M. Drancourt and J. M. Claverie, "Tropheryma whippelii Twist: a human pathogenic Actinobacteria with a reduced genome," *Genome Res.*, vol. 13, no. 8, pp. 1800-1809, 2003.
- [316] N. A. Moran, "Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens," *Cell*, vol. 108, no. 5, pp. 583-586, 2002.
- [317] M. Kowalczywska, C. Villard, D. Lafitte, F. Fenollar and D. Raoult, "Global proteomic pattern of *Tropheryma whippelii*: a Whipple's disease bacterium," *Proteomics*, vol. 9, no. 6, pp. 1593-1616, 2009.
- [318] P. Renesto, N. Crapoulet, H. Ogata, B. L. Scola, G. Vestris, J. M. Claverie and D. Raoult, "Genome-based design of a cell-free culture medium for *Tropheryma whippelii*," *Lancet*, vol. 362, pp. 447-449, 2003.
- [319] W. O. Dobbins and H. Kawanishi, "Bacillary characteristics in Whipple's disease: an electron microscopic study," *Gastroenterology*, vol. 80, no. 6, pp. 1468-1475, 1981.
- [320] M. Schoniger-Hekele, D. Petermann, B. Weber and C. Muller, "Tropheryma whippelii in the environment: survey of sewage plant influxes and sewage plant workers," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 6, pp. 2033-2035, 2007.
- [321] N. Crapoulet, P. Barbry, D. Raoult and P. Renesto, "Global transcriptome analysis of *Tropheryma whippelii* in response to temperature stresses," *J. Bacteriol.*, vol. 188, no. 14, pp. 5228-5239, 2006.
- [322] D. Raoult, F. Fenollar and M. L. Birg, "Culture of *T. whippelii* from the stool of a patient with Whipple's disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 355, no. 14, pp. 1503-1505, 2006.
- [323] M. V. La, N. Crapoulet, P. Barbry, D. Raoult and P. Renesto, "Comparative genomic analysis of *Tropheryma whippelii* strains reveals that diversity among clinical isolates is mainly related to the WiSP proteins," *BMC Genomics*, vol. 8, p. 349, 2007.
- [324] W. Li, F. Fenollar, J. M. Rolain, P. E. Fournier, G. E. Feurle, C. Muller, V. Moos, T. Marth, M. Altwegg, R. C. Calligaris-Maibach, T. Schneider, F. Biagi, B. L. Scola and D. Raoult, "Genotyping reveals a wide heterogeneity of *Tropheryma whippelii*," *Microbiology*, vol. 154, pp. 521-527, 2008.
- [325] J. C. Lagier, F. Fenollar, H. Lepidi and D. Raoult, "Evidence of lifetime susceptibility to *Tropheryma whippelii* in patients with Whipple's disease," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 66, no. 5, pp. 1188-1189, 2011.
- [326] G. Schoedon, D. Goldenberger, R. Forrer, A. Gunz, F. Dutly, M. Hochli, M. Altwegg and A. Schaffner, "Deactivation of macrophages with interleukin-4 is the key to the isolation of *Tropheryma whippelii*," *J. Infect. Dis.*, vol. 176, no. 3, pp. 672-677, 1997.
- [327] C. J. Bonhomme, P. Renesto, B. Desnues, E. Ghigo, H. Lepidi, P. Fourquet, F. Fenollar, B. Henrissat, J. L. Mege and D. Raoult, "Tropheryma whippelii glycosylation in the pathophysiologic profile of Whipple's disease," *J. Infect. Dis.*, vol. 199, pp. 1043-1052, 2009.
- [328] F. Fenollar, S. Laouira, H. Lepidi, J. M. Rolain and D. Raoult, "Value of *Tropheryma whippelii* quantitative polymerase chain reaction assay for the diagnosis of Whipple disease: usefulness of saliva and stool specimens for first-line screening," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 47, pp. 659-667, 2008.
- [329] B. L. Scola, F. Fenollar, C. Perreal and D. Raoult, "Epidemiologic implications of the first isolation and cultivation of *Tropheryma whippelii* from a saliva sample," *Ann. Intern. Med.*, vol. 154, no. 6, pp. 443-444, 2011.

- [330] A. K. Keita, H. Bassene, A. Tall, C. Sokhna, P. Ratmanov, J. F. Trape, D. Raoult and F. Fenollar, "Tropheryma whipplei: a common bacterium in rural Senegal," *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 5, no. 12, p. e1403, 2011.
- [331] F. Fenollar, J. F. Trape, H. Bassene, C. Sokhna and D. Raoult, "Tropheryma whipplei in fecal samples from children, Senegal," *Emerging Infect. Dis.*, vol. 15, no. 6, pp. 922-924, 2009.
- [332] F. Fenollar, M. Trani, B. Davoust, B. Salle, M. L. Birg, J. M. Rolain and D. Raoult, "Prevalence of asymptomatic Tropheryma whipplei carriage among humans and nonhuman primates," *J. Infect. Dis.*, vol. 197, pp. 880-887, 2008.
- [333] D. Raoult, F. Fenollar, J. M. Rolain, P. Minodier, E. Bosdure, W. Li, J. M. Garnier and H. Richet, "Tropheryma whipplei in children with gastroenteritis," *Emerging Infect. Dis.*, vol. 16, pp. 776-782, 2010.
- [334] F. Fenollar, O. Mediannikov, C. Socolovschi, H. Bassene, G. Diatta, H. Richet, A. Tall, C. Sokhna, J. F. Trape and D. Raoult, "Tropheryma whipplei bacteremia during fever in rural West Africa," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 51, no. 5, pp. 515-521, 2010.
- [335] S. Bousbia, L. Papazian, J. P. Auffray, F. Fenollar, C. Martin, W. Li, L. Chiche, B. L. Scola and D. Raoult, "Tropheryma whipplei in patients with pneumonia," *Emerging Infect. Dis.*, vol. 16, no. 2, pp. 258-263, 2010.
- [336] V. Moos, D. Kunkel, T. Marth, G. E. Feurle, B. LaScola, R. Ignatius, M. Zeitz and T. Schneider, "Reduced peripheral and mucosal Tropheryma whipplei-specific Th1 response in patients with Whipple's disease," *J. Immunol.*, vol. 177, pp. 2015-2022, 2006.
- [337] G. Greub, "A new piece added to the whipple puzzle: Tropheryma Whipplei primary infection with bacteremia and cough," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 51, no. 5, pp. 522-524, 2010.
- [338] V. Moos, C. Schmidt, A. Geelhaar, D. Kunkel, K. Allers, K. Schinnerling, C. Loddenkemper, F. Fenollar, A. Moter, D. Raoult, R. Ignatius and T. Schneider, "Impaired immune functions of monocytes and macrophages in Whipple's disease," *Gastroenterology*, vol. 138, pp. 210-220, 2010.
- [339] C. W. Adams, J. Ayres, N. L. Fagg and B. H. Hicks, "Lymph-vessel embolism in a case of Whipple's disease," *Histopathology*, vol. 9, no. 1, pp. 109-115, 1985.
- [340] D. Raoult, H. Lepidi and J. R. Harle, "Tropheryma whipplei circulating in blood monocytes," *N. Engl. J. Med.*, vol. 345, no. 7, p. 548, 2001.
- [341] B. Desnues, H. Lepidi, D. Raoult and J. L. Mege, "Whipple disease: intestinal infiltrating cells exhibit a transcriptional pattern of M2/alternatively activated macrophages," *J. Infect. Dis.*, vol. 192, no. 9, pp. 1642-1646, 2005.
- [342] K. Al Moussawi, E. Ghigo, U. Kalinke, L. Alexopoulou, J. L. Mege and B. Desnues, "Type I interferon induction is detrimental during infection with the Whipple's disease bacterium, Tropheryma whipplei," *PLoS Pathog.*, vol. 6, no. 1, p. e1000722, 2010.
- [343] E. Ghigo, A. O. Barry, L. Pretat, K. A. Moussawi, B. Desnues, C. Capo, H. Kornfeld and J. L. Mege, "IL-16 promotes T. whipplei replication by inhibiting phagosome conversion and modulating macrophage activation," *PLoS ONE*, vol. 5, no. 10, p. e13561, 2010.
- [344] L. Gorvel, K. A. Moussawi, E. Ghigo, C. Capo, J. L. Mege and B. Desnues, "Tropheryma whipplei, the Whipple's disease bacillus, induces macrophage apoptosis through the extrinsic pathway," *Cell Death Dis*, vol. 1, p. e34, 2010.
- [345] R. Bjerknes, S. Odegaard, R. Bjerkvig, B. Borkje and O. D. Laerum, "Whipple's disease. Demonstration of a persisting monocyte and macrophage dysfunction," *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 23, no. 5, pp. 611-619, 1988.
- [346] T. Marth, M. Roux, A. v. Herbay, S. C. Meuer and G. E. Feurle, "Persistent reduction of complement receptor 3 alpha-chain expressing mononuclear blood cells and transient inhibitory serum factors in Whipple's disease," *Clin. Immunol. Immunopathol.*, vol. 72, pp. 217-226, 1994.

- [347] W. W. Cruikshank, H. Kornfeld and D. M. Center, "Interleukin-16," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 67, no. 6, pp. 757-766, 2000.
- [348] A. Elssner, A. I. Doseff, M. Duncan, M. Kotur and M. D. Wewers, "IL-16 is constitutively present in peripheral blood monocytes and spontaneously released during apoptosis," *J. Immunol.*, vol. 172, no. 12, pp. 7721-7725, 2004.
- [349] M. Benoit, F. Fenollar, D. Raoult and J. L. Mege, "Increased levels of circulating IL-16 and apoptosis markers are related to the activity of Whipple's disease," *PLoS ONE*, vol. 2, p. e494, 2007.
- [350] E. Ghigo, C. Capo, M. Aurouze, C. H. Tung, J. P. Gorvel, D. Raoult and J. L. Mege, "Survival of *Tropheryma whipplei*, the agent of Whipple's disease, requires phagosome acidification," *Infect. Immun.*, vol. 70, no. 3, pp. 1501-1506, 2002.
- [351] B. Desnues, D. Raoult and J. L. Mege, "IL-16 is critical for *Tropheryma whipplei* replication in Whipple's disease," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 7, pp. 4575-4582, 2005.
- [352] K. Schinnerling, V. Moos, A. Geelhaar, K. Allers, C. Loddenkemper, J. Friebel, K. Conrad, A. A. Kuhl, U. Erben and T. Schneider, "Regulatory T Cells in Patients with Whipple's Disease," *J. Immunol.*, vol. 187, pp. 4061-4067, 2011.
- [353] A. Kalt, T. Schneider, S. Ring, J. Hoffmann, M. Zeitz, A. Stallmach, D. H. Persing and T. Marth, "Decreased levels of interleukin-12p40 in the serum of patients with Whipple's disease," *Int J Colorectal Dis*, vol. 21, pp. 114-120, 2006.
- [354] T. Marth, N. Kleen, A. Stallmach, S. Ring, S. Aziz, C. Schmidt, W. Strober, M. Zeitz and T. Schneider, "Dysregulated peripheral and mucosal Th1/Th2 response in Whipple's disease," *Gastroenterology*, vol. 123, no. 5, pp. 1468-1477, 2002.
- [355] T. Marth, M. Neurath, B. A. Cuccherini and W. Strober, "Defects of monocyte interleukin 12 production and humoral immunity in Whipple's disease," *Gastroenterology*, vol. 113, no. 2, pp. 442-448, 1997.
- [356] A. Geelhaar, V. Moos, K. Schinnerling, K. Allers, C. Loddenkemper, F. Fenollar, B. Lascola, D. Raoult and T. Schneider, "Specific and non-specific B cell function in the small intestine of patients with Whipple's disease," *Infect Immun*, 2010.
- [357] M. Eck, H. Kreipe, D. Harmsen and H. K. Muller-Hermelink, "Invasion and destruction of mucosal plasma cells by *Tropheryma whippelii*," *Hum. Pathol.*, vol. 28, no. 12, pp. 1424-1428, 1997.
- [358] N. Ectors, K. Geboes, R. D. Vos, H. Heidbuchel, P. Rutgeerts, V. Desmet and G. Vantrappen, "Whipple's disease: a histological, immunocytochemical and electronmicroscopic study of the immune response in the small intestinal mucosa," *Histopathology*, vol. 21, no. 1, pp. 1-12, 1992.
- [359] A. J. Macpherson, D. Gatto, E. Sainsbury, G. R. Harriman, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel, "A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria," *Science*, vol. 288, no. 5474, pp. 2222-2226, 2000.
- [360] F. Fenollar, B. Amphoux and D. Raoult, "A paradoxical *Tropheryma whipplei* western blot differentiates patients with whipple disease from asymptomatic carriers," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 49, pp. 717-723, 2009.
- [361] T. Schneider, A. Stallmach, A. v. Herbay, T. Marth, W. Strober and M. Zeitz, "Treatment of refractory Whipple disease with interferon-gamma," *Ann. Intern. Med.*, vol. 129, no. 11, pp. 875-877, 1998.
- [362] S. Della Bella, L. Bierti, P. Presicce, R. Arienti, M. Valenti, M. Saresella, C. Vergani and M. L. Villa, "Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly," *Clin. Immunol.*, vol. 122, no. 2, pp. 220-228, 2007.
- [363] S. Miltenyi, W. Muller, W. Weichel and A. Radbruch, "High gradient magnetic cell separation with MACS," *Cytometry*, vol. 11, no. 2, pp. 231-238, 1990.

- [364] A. B. Lyons and C. R. Parish, "Determination of lymphocyte division by flow cytometry," *J. Immunol. Methods*, vol. 171, no. 1, pp. 131-137, 1994.
- [365] A. B. Lyons, "Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution," *J. Immunol. Methods*, vol. 243, no. 1-2, pp. 147-154, 2000.
- [366] N. Romani, D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kampgen, B. Eibl, D. Niederwieser and G. Schuler, "Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability," *J. Immunol. Methods*, vol. 196, no. 2, pp. 137-151, 1996.
- [367] B. Feuerstein, T. G. Berger, C. Maczek, C. Roder, D. Schreiner, U. Hirsch, I. Haendle, W. Leisgang, A. Glaser, O. Kuss, T. L. Diepgen, G. Schuler and B. Schuler-Thurner, "A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use," *J. Immunol. Methods*, vol. 245, no. 1-2, pp. 15-29, 2000.
- [368] G. Schuler, B. Schuler-Thurner and R. M. Steinman, "The use of dendritic cells in cancer immunotherapy," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 15, no. 2, pp. 138-147, 2003.
- [369] M. Dauer, B. Obermaier, J. Hertel, C. Haerle, K. Pohl, S. Rothenfusser, M. Schnurr, S. Endres and A. Eigler, "Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors," *J. Immunol.*, vol. 170, no. 8, pp. 4069-4076, 2003.
- [370] B. Obermaier, M. Dauer, J. Hertel, K. Schad, S. Endres and A. Eigler, "Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes," *Biol Proced Online*, vol. 5, no. , pp. 197-203, 2003.
- [371] M. A. Suni, L. J. Picker and V. C. Maino, "Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry," *J. Immunol. Methods*, vol. 212, no. 1, pp. 89-98, 1998.
- [372] T. Proft and J. Fraser, "Superantigens: just like peptides only different," *J. Exp. Med.*, vol. 187, no. 6, pp. 819-821, 1998.
- [373] T. Udagawa, D. G. Woodside and B. W. McIntyre, "Alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29) integrin costimulation of human T cells enhances transcription factor and cytokine induction in the absence of altered sensitivity to anti-CD3 stimulation," *J. Immunol.*, vol. 157, no. 5, pp. 1965-1972, 1996.
- [374] M. C. Gauduin, "Intracellular cytokine staining for the characterization and quantitation of antigen-specific T lymphocyte responses," *Methods*, vol. 38, no. 4, pp. 263-273, 2006.
- [375] G. Alter, J. M. Malenfant and M. Altfeld, "CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity," *J. Immunol. Methods*, vol. 294, no. 1-2, pp. 15-22, 2004.
- [376] B. Sander, J. Andersson and U. Andersson, "Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure," *Immunol. Rev.*, vol. 119, pp. 65-93, 1991.
- [377] J. Pacanowski, S. Kahi, M. Baillet, P. Lebon, C. Deveau, C. Goujard, L. Meyer, E. Oksenhendler, M. Sinet and A. Hosmalin, "Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection," *Blood*, vol. 98, pp. 3016-3021, 2001.
- [378] M. Rimbart, M. Hamidou, C. Braudeau, X. Puechal, L. Teixeira, H. Caillon, A. Neel, M. Audrain, L. Guillevin and R. Josien, "Decreased numbers of blood dendritic cells and defective function of regulatory T cells in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis," *PLoS ONE*, vol. 6, p. e18734, 2011.
- [379] E. Engvall and P. Perlmann, "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G," *Immunochemistry*, vol. 8, no. 9, pp. 871-874, 1971.
- [380] B. K. van Weemen and A. H. Schuur, "Immunoassay using antigen-enzyme conjugates," *FEBS Lett.*, vol. 15, no. 3, pp. 232-236, 1971.

- [381] H. H. Ussing, "The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies," *Acta Physiol. Scand.*, vol. 17, no. 1, pp. 1-37, 1949.
- [382] M. Fromm, J. D. Schulzke and U. Hegel, "Control of electrogenic Na⁺ absorption in rat late distal colon by nanomolar aldosterone added in vitro," *Am. J. Physiol.*, vol. 264, no. 1 Pt 1, pp. 68-73, 1993.
- [383] S. Wilhelm, B. Gröbler, M. Gluch and H. Heinz, "Mikroskopie von Carl Zeiss. Grundlagen: Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie. Optische Abbildung. Elektronische Signalverarbeitung," 2001.
- [384] C. Cheong, I. Matos, J. H. Choi, D. B. Dandamudi, E. Shrestha, M. P. Longhi, K. L. Jeffrey, R. M. Anthony, C. Kluger, G. Nchinda, H. Koh, A. Rodriguez, J. Idoyaga, M. Pack, K. Velinzon, C. G. Park and R. M. Steinman, "Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas," *Cell*, vol. 143, pp. 416-429, 2010.
- [385] E. A. van Vré, J. M. Bosmans, I. V. Brussel, M. Maris, G. R. De, P. E. Van, C. J. Vrints and H. Bult, "Immunohistochemical characterisation of dendritic cells in human atherosclerotic lesions: possible pitfalls," *Pathology*, vol. 43, no. 3, pp. 239-247, 2011.
- [386] D. Nagorsen, S. Voigt, E. Berg, H. Stein, E. Thiel and C. Loddenkemper, "Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival," *J Transl Med*, vol. 5, p. 62, 2007.
- [387] G. E. Feurle, B. Dorken, E. Schopf and V. Lenhard, "HLA B27 and defects in the T-cell system in Whipple's disease," *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 9, pp. 385-389, 1979.
- [388] X. Wang, H. Xu, A. F. Gill, B. Pahar, D. Kempf, T. Rasmussen, A. A. Lackner and R. S. Veazey, "Monitoring alpha4beta7 integrin expression on circulating CD4⁺ T cells as a surrogate marker for tracking intestinal CD4⁺ T-cell loss in SIV infection," *Mucosal Immunol*, vol. 2, pp. 518-526, 2009.
- [389] A. Di Sabatino, L. Rovedatti, M. M. Rosado, R. Carsetti, G. R. Corazza and T. T. MacDonald, "Increased expression of mucosal addressin cell adhesion molecule 1 in the duodenum of patients with active celiac disease is associated with depletion of integrin alpha4beta7-positive T cells in blood," *Hum. Pathol.*, vol. 40, pp. 699-704, 2009.
- [390] D. Xu, J. Fu, L. Jin, H. Zhang, C. Zhou, Z. Zou, J. M. Zhao, B. Zhang, M. Shi, X. Ding, Z. Tang, Y. X. Fu and F. S. Wang, "Circulating and liver resident CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B," *J. Immunol.*, vol. 177, pp. 739-747, 2006.
- [391] X. Bi, Y. Suzuki, H. Gatanaga and S. Oka, "High frequency and proliferation of CD4⁺ FOXP3⁺ Treg in HIV-1-infected patients with low CD4 counts," *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, pp. 301-309, 2009.
- [392] L. Li, S. H. Lao and C. Y. Wu, "Increased frequency of CD4(+)CD25(high) Treg cells inhibit BCG-specific induction of IFN-gamma by CD4(+) T cells from TB patients," *Tuberculosis (Edinb)*, vol. 87, pp. 526-534, 2007.
- [393] F. Flores-Borja, E. C. Jury, C. Mauri and M. R. Ehrenstein, "Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 105, pp. 19396-19401, 2008.
- [394] D. K. Sojka, A. Hughson and D. J. Fowell, "CTLA-4 is required by CD4⁺CD25⁺ Treg to control CD4⁺ T-cell lymphopenia-induced proliferation," *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, pp. 1544-1551, 2009.
- [395] J. M. Fletcher, R. Lonergan, L. Costelloe, K. Kinsella, B. Moran, C. O'Farrelly, N. Tubridy and K. H. Mills, "CD39⁺Foxp3⁺ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis," *J. Immunol.*, vol. 183, pp. 7602-7610, 2009.

- [396] L. S. Walker, "Regulatory T cells overturned: the effectors fight back," *Immunology*, vol. 126, pp. 466-474, 2009.
- [397] P. D. Hughes, G. T. Belz, K. A. Fortner, R. C. Budd, A. Strasser and P. Bouillet, "Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity," *Immunity*, vol. 28, pp. 197-205, 2008.
- [398] K. Robinson, R. Kenefeck, E. L. Pidgeon, S. Shakib, S. Patel, R. J. Polson, A. M. Zaitoun and J. C. Atherton, "Helicobacter pylori-induced peptic ulcer disease is associated with inadequate regulatory T cell responses," *Gut*, vol. 57, no. 10, pp. 1375-1385, 2008.
- [399] H. J. Epple, C. Loddenkemper, D. Kunkel, H. Troger, J. Maul, V. Moos, E. Berg, R. Ullrich, J. D. Schulzke, H. Stein, R. Duchmann, M. Zeitz and T. Schneider, "Mucosal but not peripheral FOXP3+ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART," *Blood*, vol. 108, pp. 3072-3078, 2006.
- [400] Y. Zhong, A. Cantwell and P. H. Dube, "Transforming growth factor beta and CD25 are important for controlling systemic dissemination following Yersinia enterocolitica infection of the gut," *Infect. Immun.*, vol. 78, no. 9, pp. 3716-3725, 2010.
- [401] S. L. Jongbloed, M. C. Lebre, A. R. Fraser, J. A. Gracie, R. D. Sturrock, P. P. Tak and I. B. McInnes, "Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 8, no. 1, p. R15, 2006.
- [402] J.-C. E. Wang, J. J. Kobie, L. Zhang, M. Cochran, T. R. Mosmann, C. T. Ritchlin and S. A. Quataert, "An 11-color flow cytometric assay for identifying, phenotyping, and assessing endocytic ability of peripheral blood dendritic cell subsets in a single platform," *J. Immunol. Methods*, vol. 341, pp. 106-116, 2009.
- [403] H. Donaghy, A. Pozniak, B. Gazzard, N. Qazi, J. Gilmour, F. Gotch and S. Patterson, "Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load," *Blood*, vol. 98, pp. 2574-2576, 2001.
- [404] K. Uehira, R. Amakawa, T. Ito, K. Tajima, S. Naitoh, Y. Ozaki, T. Shimizu, K. Yamaguchi, Y. Uemura, H. Kitajima, S. Yonezu and S. Fukuhara, "Dendritic cells are decreased in blood and accumulated in granuloma in tuberculosis," *Clin. Immunol.*, vol. 105, pp. 296-303, 2002.
- [405] T. Kanto, M. Inoue, H. Miyatake, A. Sato, M. Sakakibara, T. Yakushijin, C. Oki, I. Itose, N. Hiramatsu, T. Takehara, A. Kasahara and N. Hayashi, "Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection," *J. Infect. Dis.*, vol. 190, pp. 1919-1926, 2004.
- [406] M. Ota, R. Amakawa, K. Uehira, T. Ito, Y. Yagi, A. Oshiro, Y. Date, H. Oyaizu, T. Shigeki, Y. Ozaki, K. Yamaguchi, Y. Uemura, S. Yonezu and S. Fukuhara, "Involvement of dendritic cells in sarcoidosis," *Thorax*, vol. 59, no. 5, pp. 408-413, 2004.
- [407] V. Gupta, A. Jaiswal, D. Behera and H. K. Prasad, "Disparity in circulating peripheral blood dendritic cell subsets and cytokine profile of pulmonary tuberculosis patients compared with healthy family contacts," *Hum. Immunol.*, vol. 71, no. 7, pp. 682-691, 2010.
- [408] F. Grassi, A. Hosmalin, D. McIlroy, V. Calvez, P. Debre and B. Autran, "Depletion in blood CD11c-positive dendritic cells from HIV-infected patients," *AIDS*, vol. 13, pp. 759-766, 1999.
- [409] D. Hawiger, K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R. M. Steinman and M. C. Nussenzweig, "Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo," *J. Exp. Med.*, vol. 194, pp. 769-779, 2001.
- [410] G. Penna, S. Sozzani and L. Adorini, "Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells," *J. Immunol.*, vol. 167, no. 4, pp. 1862-1866, 2001.

- [411] L. J. Robays, T. Maes, S. Lebecque, S. A. Lira, W. A. Kuziel, G. G. Brusselle, G. F. Joos and K. V. Vermaelen, "Chemokine receptor CCR2 but not CCR5 or CCR6 mediates the increase in pulmonary dendritic cells during allergic airway inflammation," *J. Immunol.*, vol. 178, no. 8, pp. 5305-5311, 2007.
- [412] A. Yoshida, H. Isomoto, J. Hisatsune, M. Nakayama, Y. Nakashima, K. Matsushima, Y. Mizuta, T. Hayashi, Y. Yamaoka, T. Azuma, J. Moss, T. Hirayama and S. Kohno, "Enhanced expression of CCL20 in human *Helicobacter pylori*-associated gastritis," *Clin. Immunol.*, vol. 130, no. 3, pp. 290-297, 2009.
- [413] L. L. Cavanagh, R. Bonasio, I. B. Mazo, C. Halin, G. Cheng, A. W. van, A. Cariappa, C. Chase, P. Russell, M. N. Starnbach, P. A. Koni, S. Pillai, W. Weninger and U. H. von, "Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells," *Nat. Immunol.*, vol. 6, no. 10, pp. 1029-1037, 2005.
- [414] M. Raki, S. Tollefsen, Ø. Molberg, K. E. Lundin, L. M. Sollid and F. L. Jahnsen, "A unique dendritic cell subset accumulates in the celiac lesion and efficiently activates gluten-reactive T cells," *Gastroenterology*, vol. 131, no. 2, pp. 428-438, 2006.
- [415] A. Di Sabatino, K. M. Pickard, J. N. Gordon, V. Salvati, G. Mazzarella, R. M. Beattie, A. Vossenkaemper, L. Rovedatti, N. A. Leakey, N. M. Croft, R. Troncone, G. R. Corazza, A. J. Stagg, G. Monteleone and T. T. MacDonald, "Evidence for the role of interferon- α production by dendritic cells in the Th1 response in celiac disease," *Gastroenterology*, vol. 133, no. 4, pp. 1175-1187, 2007.
- [416] L. Tailleux, O. Schwartz, J. L. Herrmann, E. Pivert, M. Jackson, A. Amara, L. Legres, D. Dreher, L. P. Nicod, J. C. Gluckman, P. H. Lagrange, B. Gicquel and O. Neyrolles, "DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells," *J. Exp. Med.*, vol. 197, no. 1, pp. 121-127, 2003.
- [417] A. A. te Velde, Y. van Kooyk, H. Braat, D. W. Hommes, T. A. Dellemijn, J. F. Slors, S. J. van and F. A. Vyth-Dreese, "Increased expression of DC-SIGN+IL-12+IL-18+ and CD83+IL-12-IL-18- dendritic cell populations in the colonic mucosa of patients with Crohn's disease," *Eur. J. Immunol.*, vol. 33, no. 1, pp. 143-151, 2003.
- [418] P. L. van Lent, C. G. Figdor, P. Barrera, K. v. Ginkel, A. Sloetjes, W. B. van and R. Torensma, "Expression of the dendritic cell-associated C-type lectin DC-SIGN by inflammatory matrix metalloproteinase-producing macrophages in rheumatoid arthritis synovium and interaction with intercellular adhesion molecule 3-positive T cells," *Arthritis Rheum.*, vol. 48, no. 2, pp. 360-369, 2003.
- [419] A. Granelli-Piperno, A. Pritsker, M. Pack, I. Shimeliovich, J. F. Arrighi, C. G. Park, C. Trumfheller, V. Piguet, T. M. Moran and R. M. Steinman, "Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 7, pp. 4265-4273, 2005.
- [420] N. Kamada, T. Hisamatsu, S. Okamoto, H. Chinen, T. Kobayashi, T. Sato, A. Sakuraba, M. T. Kitazume, A. Sugita, K. Koganei, K. S. Akagawa and T. Hibi, "Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- γ axis," *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 6, pp. 2269-2280, 2008.
- [421] A. C. Beitnes, M. Raki, M. Brottveit, K. E. Lundin, F. L. Jahnsen and L. M. Sollid, "Rapid accumulation of CD14+CD11c+ dendritic cells in gut mucosa of celiac disease after in vivo gluten challenge," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 3, p. e33556, 2012.
- [422] Y. Ikeda, F. Akbar, H. Matsui and M. Onji, "Characterization of antigen-presenting dendritic cells in the peripheral blood and colonic mucosa of patients with ulcerative colitis," *Eur J Gastroenterol Hepatol*, vol. 13, no. 7, pp. 841-850, 2001.

- [423] A. B. Pulimood, B. S. Ramakrishna, A. B. Rita, P. Srinivasan, V. Mohan, S. Gupta, B. Perakath, G. Kang, G. Chandy and K. A. Balasubramanian, "Early activation of mucosal dendritic cells and macrophages in acute *Campylobacter colitis* and cholera: An in vivo study," *J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 23, no. 5, pp. 752-758, 2008.
- [424] M. Rimoldi, M. Chieppa, P. Larghi, M. Vulcano, P. Allavena and M. Rescigno, "Monocyte-derived dendritic cells activated by bacteria or by bacteria-stimulated epithelial cells are functionally different," *Blood*, vol. 106, no. 8, pp. 2818-2826, 2005.
- [425] M. Chieppa, M. Rescigno, A. Y. Huang and R. N. Germain, "Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement," *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 13, pp. 2841-2852, 2006.
- [426] G. J. Randolph, K. Inaba, D. F. Robbani, R. M. Steinman and W. A. Muller, "Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo," *Immunity*, vol. 11, no. 6, pp. 753-761, 1999.
- [427] M. G. Betjes, M. C. Haks, C. W. Tuk and R. H. Beelen, "Monoclonal antibody EBM11 (anti-CD68) discriminates between dendritic cells and macrophages after short-term culture," *Immunobiology*, vol. 183, no. 1-2, pp. 79-87, 1991.
- [428] S. R. Krutzik, B. Tan, H. Li, M. T. Ochoa, P. T. Liu, S. E. Sharfstein, T. G. Graeber, P. A. Sieling, Y. J. Liu, T. H. Rea, B. R. Bloom and R. L. Modlin, "TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells," *Nat. Med.*, vol. 11, no. 6, pp. 653-660, 2005.
- [429] B. O. Fabrick, R. v. Bruggen, D. M. Deng, A. J. Ligtenberg, K. Nazmi, K. Schornagel, R. P. Vloet, C. D. Dijkstra and T. K. van, "The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria," *Blood*, vol. 113, no. 4, pp. 887-892, 2009.
- [430] E. Angelakis, F. Fenollar, H. Lepidi, M. L. Birg and D. Raoult, "*Tropheryma whipplei* in the skin of patients with classic Whipple's disease," *J. Infect.*, vol. 61, no. 3, pp. 266-269, 2010.
- [431] T. Ito, D. Kobayashi, K. Uchida, T. Takemura, S. Nagaoka, I. Kobayashi, T. Yokoyama, I. Ishige, Y. Ishige, N. Ishida, A. Furukawa, H. Muraoka, S. Ikeda, M. Sekine, N. Ando, Y. Suzuki, T. Yamada, T. Suzuki and Y. Eishi, "*Helicobacter pylori* invades the gastric mucosa and translocates to the gastric lymph nodes," *Lab. Invest.*, vol. 88, no. 6, pp. 664-681, 2008.
- [432] A. J. Wolf, B. Linas, G. J. Trevejo-Nunez, E. Kincaid, T. Tamura, K. Takatsu and J. D. Ernst, "Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo," *J. Immunol.*, vol. 179, no. 4, pp. 2509-2519, 2007.
- [433] B. A. Smith, S. Gartner, Y. Liu, A. S. Perelson, N. I. Stilianakis, B. F. Keele, T. M. Kerkering, A. Ferreira-Gonzalez, A. K. Szakal, J. G. Tew and G. F. Burton, "Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells," *J. Immunol.*, vol. 166, no. 1, pp. 690-696, 2001.
- [434] G. M. Wilcox, B. S. Tronic, D. J. Schecter, M. J. Arron, D. F. Righi and N. J. Weiner, "Periodic acid-Schiff-negative granulomatous lymphadenopathy in patients with Whipple's disease. Localization of the Whipple bacillus to noncaseating granulomas by electron microscopy," *Am. J. Med.*, vol. 83, no. 1, pp. 165-170, 1987.
- [435] A. Popov, J. Driesen, Z. Abdullah, C. Wickenhauser, M. Beyer, S. Debey-Pascher, T. Saric, S. Kummer, O. Takikawa, E. Domann, T. Chakraborty, M. Kronke, O. Utermohlen and J. L. Schultze, "Infection of myeloid dendritic cells with *Listeria monocytogenes* leads to the suppression of T cell function by multiple inhibitory mechanisms," *J. Immunol.*, vol. 181, no. 7, pp. 4976-4988, 2008.
- [436] E. J. Soilleux, L. S. Morris, G. Leslie, J. Chehimi, Q. Luo, E. Levroney, J. Trowsdale, L. J. Montaner, R. W. Doms, D. Weissman, N. Coleman and B. Lee, "Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 71, no. 3, pp. 445-457, 2002.

- [437] K. Takahashi, A. Kenji, T. Norihiro, K. Eisaku, O. Takashi, H. Kazuhiko, Y. Tadashi and A. Tadaatsu, "Morphological interactions of interdigitating dendritic cells with B and T cells in human mesenteric lymph nodes," *Am. J. Pathol.*, vol. 159, no. 1, pp. 131-138, 2001.
- [438] I. J. de Vries, W. J. Lesterhuis, J. O. Barentsz, P. Verdijk, J. H. van, O. C. Boerman, W. J. Oyen, J. J. Bonenkamp, J. B. Boezeman, G. J. Adema, J. W. Bulte, T. W. Scheenen, C. J. Punt, A. Heerschap and C. G. Figdor, "Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy," *Nat. Biotechnol.*, vol. 23, no. 11, pp. 1407-1413, 2005.
- [439] F. Katou, H. Ohtani, T. Nakayama, H. Nagura, O. Yoshie and K. Motegi, "Differential expression of CCL19 by DC-Lamp+ mature dendritic cells in human lymph node versus chronically inflamed skin," *J. Pathol.*, vol. 199, no. 1, pp. 98-106, 2003.
- [440] T. Papadas, A. Batistatou, P. Ravazoula, V. Zolota and P. Goumas, "S-100 protein-positive dendritic cells and CD34-positive dendritic interstitial cells in palatine tonsils," *Eur Arch Otorhinolaryngol*, vol. 258, no. 5, pp. 243-245, 2001.
- [441] F. Niedergang, A. Didierlaurent, J. P. Kraehenbuhl and J. C. Sirard, "Dendritic cells: the host Achille's heel for mucosal pathogens?," *Trends Microbiol.*, vol. 12, no. 2, pp. 79-88, 2004.
- [442] H. Lepidi, N. Costedoat, J. C. Piette, J. R. Harle and D. Raoult, "Immunohistological detection of *Tropheryma whipplei* (Whipple bacillus) in lymph nodes," *Am. J. Med.*, vol. 113, no. 4, pp. 334-336, 2002.
- [443] M. B. Lutz and G. Schuler, "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?," *Trends Immunol.*, vol. 23, no. 9, pp. 445-449, 2002.
- [444] C. Du and S. Sriram, "Mechanism of inhibition of LPS-induced IL-12p40 production by IL-10 and TGF-beta in ANA-1 cells," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 64, no. 1, pp. 92-97, 1998.
- [445] C. Pardoux, X. Ma, S. Gobert, S. Pellegrini, P. Mayeux, F. Gay, G. Trinchieri and S. Chouaib, "Downregulation of interleukin-12 (IL-12) responsiveness in human T cells by transforming growth factor-beta: relationship with IL-12 signaling," *Blood*, vol. 93, no. 5, pp. 1448-1455, 1999.
- [446] O. Filipe-Santos, J. Bustamante, A. Chapgier, G. Vogt, L. d. Beaucoudrey, J. Feinberg, E. Jouanguy, S. Boisson-Dupuis, C. Fieschi, C. Picard and J. L. Casanova, "Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features," *Semin. Immunol.*, vol. 18, no. 6, pp. 347-361, 2006.
- [447] S. A. Khader, J. E. Pearl, K. Sakamoto, L. Gilmartin, G. K. Bell, D. M. Jelley-Gibbs, N. Ghilardi, F. deSavage and A. M. Cooper, "IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 2, pp. 788-795, 2005.
- [448] L. A. Lieberman, F. Cardillo, A. M. Owyang, D. M. Rennick, D. J. Cua, R. A. Kastelein and C. A. Hunter, "IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12," *J. Immunol.*, vol. 173, no. 3, pp. 1887-1893, 2004.
- [449] M. Skold and S. M. Behar, "Tuberculosis triggers a tissue-dependent program of differentiation and acquisition of effector functions by circulating monocytes," *J. Immunol.*, vol. 181, no. 9, pp. 6349-6360, 2008.
- [450] A. V. Hill, "Genetics and genomics of infectious disease susceptibility," *Br. Med. Bull.*, vol. 55, no. 2, pp. 401-413, 1999.
- [451] S. A. da Silva, P. S. Mazini, P. G. Reis, A. M. Sell, L. T. Tsuneto, P. R. Peixoto and J. E. Visentainer, "HLA-DR and HLA-DQ alleles in patients from the south of Brazil: markers for leprosy susceptibility and resistance," *BMC Infect. Dis.*, vol. 9, p. 134, 2009.

- [452] A. E. Goldfeld, J. C. Delgado, S. Thim, M. V. Bozon, A. M. Ugliero, D. Turbay, C. Cohen and E. J. Yunis, "Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis," *JAMA*, vol. 279, no. 3, pp. 226-228, 1998.
- [453] U. G. Wagner, K. Koetz, C. M. Weyand and J. J. Goronzy, "Perturbation of the T cell repertoire in rheumatoid arthritis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 95, no. 24, pp. 14447-14452, 1998.
- [454] L. Yin, Z. C. Kou, C. Rodriguez, W. Hou, M. M. Goodenow and J. W. Sleasman, "Antiretroviral therapy restores diversity in the T-cell receptor Vbeta repertoire of CD4 T-cell subpopulations among human immunodeficiency virus type 1-infected children and adolescents," *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 16, no. 9, pp. 1293-1301, 2009.
- [455] R. P. Phipps, S. H. Stein and R. L. Roper, "A new view of prostaglandin E regulation of the immune response," *Immunol. Today*, vol. 12, no. 10, pp. 349-352, 1991.
- [456] K. J. Maloy and F. Powrie, "Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease," *Nature*, vol. 474, no. 7351, pp. 298-306, 2011.
- [457] F. Baratelli, K. Krysan, N. Heuze-Vourc'h, L. Zhu, B. Escudero, S. Sharma, K. Reckamp, M. Dohadwala and S. M. Dubinett, "PGE2 confers survivin-dependent apoptosis resistance in human monocyte-derived dendritic cells," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 78, no. 2, pp. 555-564, 2005.
- [458] S. Della Bella, S. Nicola, I. Timofeeva, M. L. Villa, A. Santoro and A. C. Berardi, "Are interleukin-16 and thrombopoietin new tools for the in vitro generation of dendritic cells?," *Blood*, vol. 104, no. 13, pp. 4020-4028, 2004.
- [459] W. W. Cruikshank, K. Lim, A. C. Theodore, J. Cook, G. Fine, P. F. Weller and D. M. Center, "IL-16 inhibition of CD3-dependent lymphocyte activation and proliferation," *J. Immunol.*, vol. 157, no. 12, pp. 5240-5248, 1996.
- [460] C. McFadden, R. Morgan, S. Rahangdale, D. Green, H. Yamasaki, D. Center and W. Cruikshank, "Preferential migration of T regulatory cells induced by IL-16," *J. Immunol.*, vol. 179, no. 10, pp. 6439-6445, 2007.
- [461] A. Snijders, P. Kalinski, C. M. Hilkens and M. L. Kapsenberg, "High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals," *Int. Immunol.*, vol. 10, no. 11, pp. 1593-1598, 1998.
- [462] A. Granelli-Piperno, A. Golebiowska, C. Trumpfheller, F. P. Siegal and R. M. Steinman, "HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 101, no. 20, pp. 7669-7674, 2004.
- [463] W. Vermi, F. Facchetti, E. Riboldi, H. Heine, S. Scutera, S. Stornello, D. Ravarino, P. Cappello, M. Giovarelli, R. Badolato, M. Zucca, F. Gentili, M. Chilosi, C. Doglioni, A. N. Ponzi, S. Sozzani and T. Musso, "Role of dendritic cell-derived CXCL13 in the pathogenesis of *Bartonella henselae* B-rich granuloma," *Blood*, vol. 107, no. 2, pp. 454-462, 2006.
- [464] A. Smed-Sorensen, K. Lore, L. Walther-Jallow, J. Andersson and A. L. Spetz, "HIV-1-infected dendritic cells up-regulate cell surface markers but fail to produce IL-12 p70 in response to CD40 ligand stimulation," *Blood*, vol. 104, no. 9, pp. 2810-2817, 2004.
- [465] S. Jang, S. Uematsu, S. Akira and P. Salgame, "IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in response to *Mycobacterium tuberculosis* is predominantly dependent on TLR2-mediated recognition," *J. Immunol.*, vol. 173, no. 5, pp. 3392-3397, 2004.
- [466] S. I. Gringhuis, J. d. Dunnen, M. Litjens, B. v. Het, Y. v. Kooyk and T. B. Geijtenbeek, "C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB," *Immunity*, vol. 26, no. 5, pp. 605-616, 2007.
- [467] T. B. Geijtenbeek, S. J. Van, E. A. Koppel, M. Sanchez-Hernandez, C. M. Vandenbroucke-Grauls, B. Appelmelk and Y. V. Kooyk, "Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function," *J. Exp. Med.*, vol. 197, no. 1, pp. 7-17, 2003.

- [468] H. H. Smits, A. Engering, D. v. der, E. C. de, K. Schipper, T. M. van, B. A. Zaat, M. Yazdanbakhsh, E. A. Wierenga, Y. v. Kooyk and M. L. Kapsenberg, "Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 115, no. 6, pp. 1260-1267, 2005.
- [469] T. B. Geijtenbeek, D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van, G. C. van, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor and Y. v. Kooyk, "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells," *Cell*, vol. 100, no. 5, pp. 587-597, 2000.
- [470] N. Barois, B. d. Saint-Vis, S. Lebecque, H. J. Geuze and M. J. Kleijmeer, "MHC class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation," *Traffic*, vol. 3, no. 12, pp. 894-905, 2002.
- [471] L. Tailleux, O. Neyrolles, S. Honore-Bouakline, E. Perret, F. Sanchez, J. P. Abastado, P. H. Lagrange, J. C. Gluckman, M. Rosenzweig and J. L. Herrmann, "Constrained intracellular survival of Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells," *J. Immunol.*, vol. 170, no. 4, pp. 1939-1948, 2003.
- [472] K. A. Bodnar, N. V. Serbina and J. L. Flynn, "Fate of Mycobacterium tuberculosis within murine dendritic cells," *Infect. Immun.*, vol. 69, no. 2, pp. 800-809, 2001.
- [473] M. Dauer, K. Pohl, B. Obermaier, T. Meskendahl, J. Robe, M. Schnurr, S. Endres and A. Eigler, "Interferon-alpha disables dendritic cell precursors: dendritic cells derived from interferon-alpha-treated monocytes are defective in maturation and T-cell stimulation," *Immunology*, vol. 110, no. 1, pp. 38-47, 2003.
- [474] F. P. Huang, N. Platt, M. Wykes, J. R. Major, T. J. Powell, C. D. Jenkins and G. G. MacPherson, "A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes," *J. Exp. Med.*, vol. 191, no. 3, pp. 435-444, 2000.
- [475] L. Luo and T. Li, "Idiopathic CD4 lymphocytopenia and opportunistic infection--an update," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 54, no. 3, pp. 283-289, 2008.
- [476] A. Lundgren, E. Suri-Payer, K. Enarsson, A. M. Svennerholm and B. S. Lundin, "Helicobacter pylori-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to H. pylori in infected individuals," *Infect. Immun.*, vol. 71, no. 4, pp. 1755-1762, 2003.
- [477] J. Andersson, A. Boasso, J. Nilsson, R. Zhang, N. J. Shire, S. Lindback, G. M. Shearer and C. A. Chougnet, "The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients," *J. Immunol.*, vol. 174, no. 6, pp. 3143-3147, 2005.
- [478] Y. Belkaid, C. A. Piccirillo, S. Mendez, E. M. Shevach and D. L. Sacks, "CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity," *Nature*, vol. 420, no. 6915, pp. 502-507, 2002.
- [479] S. Suvas, A. K. Azkur, B. S. Kim, U. Kumaraguru and B. T. Rouse, "CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions," *J. Immunol.*, vol. 172, no. 7, pp. 4123-4132, 2004.
- [480] L. Weiss, V. Donkova-Petrini, L. Caccavelli, M. Balbo, C. Carbonneil and Y. Levy, "Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients," *Blood*, vol. 104, no. 10, pp. 3249-3256, 2004.
- [481] T. Boettler, H. C. Spangenberg, C. Neumann-Haefelin, E. Panther, S. Urbani, C. Ferrari, H. E. Blum, F. v. Weizsacker and R. Thimme, "T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection," *J. Virol.*, vol. 79, no. 12, pp. 7860-7867, 2005.

- [482] J. P. Scott-Browne, S. Shafiani, G. Tucker-Heard, K. Ishida-Tsubota, J. D. Fontenot, A. Y. Rudensky, M. J. Bevan and K. B. Urdahl, "Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis," *J. Exp. Med.*, vol. 204, no. 9, pp. 2159-2169, 2007.
- [483] Y. Zheng, C. N. Manzotti, F. Burke, L. Dussably, O. Qureshi, L. S. Walker and D. M. Sansom, "Acquisition of suppressive function by activated human CD4+ CD25- T cells is associated with the expression of CTLA-4 not FoxP3," *J. Immunol.*, vol. 181, pp. 1683-1691, 2008.
- [484] S. Read, V. Malmstrom and F. Powrie, "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation," *J. Exp. Med.*, vol. 192, pp. 295-302, 2000.
- [485] H. B. Park, D. J. Paik, E. Jang, S. Hong and J. Youn, "Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4+CD25- T cells," *Int. Immunol.*, vol. 16, pp. 1203-1213, 2004.
- [486] S. G. Zheng, J. H. Wang, W. Stohl, K. S. Kim, J. D. Gray and D. A. Horwitz, "TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells," *J. Immunol.*, vol. 176, pp. 3321-3329, 2006.
- [487] Y. Y. Lan, Z. Wang, G. Raimondi, W. Wu, B. L. Colvin, A. d. Creus and A. W. Thomson, "'Alternatively activated' dendritic cells preferentially secrete IL-10, expand Foxp3+CD4+ T cells, and induce long-term organ allograft survival in combination with CTLA4-Ig," *J. Immunol.*, vol. 177, no. 9, pp. 5868-5877, 2006.
- [488] K. Mahnke, T. Bedke and A. H. Enk, "Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression," *Cell. Immunol.*, vol. 250, pp. 1-13, 2007.
- [489] T. L. Denning, Y. C. Wang, S. R. Patel, I. R. Williams and B. Pulendran, "Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses," *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 10, pp. 1086-1094, 2007.
- [490] U. Hadis, B. Wahl, O. Schulz, M. Hardtke-Wolenski, A. Schippers, N. Wagner, W. Muller, T. Sparwasser, R. Forster and O. Pabst, "Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria," *Immunity*, vol. 34, no. 2, pp. 237-246, 2011.
- [491] N. D. Savage, T. d. Boer, K. V. Walburg, S. A. Joosten, K. v. Meijgaarden, A. Geluk and T. H. Ottenhoff, "Human anti-inflammatory macrophages induce Foxp3+ GITR+ CD25+ regulatory T cells, which suppress via membrane-bound TGFbeta-1," *J. Immunol.*, vol. 181, pp. 2220-2226, 2008.
- [492] J. L. Coombes and F. Powrie, "Dendritic cells in intestinal immune regulation," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 6, pp. 435-446, 2008.
- [493] T. Onodera, M. H. Jang, Z. Guo, M. Yamasaki, T. Hirata, Z. Bai, N. M. Tsuji, D. Nagakubo, O. Yoshie, S. Sakaguchi, O. Takikawa and M. Miyasaka, "Constitutive expression of IDO by dendritic cells of mesenteric lymph nodes: functional involvement of the CTLA-4/B7 and CCL22/CCR4 interactions," *J. Immunol.*, vol. 183, no. 9, pp. 5608-5614, 2009.
- [494] H. B. Ji, G. Liao, W. A. Faubion, A. C. Abadia-Molina, C. Cozzo, F. S. Laroux, A. Caton and C. Terhorst, "Cutting edge: the natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression," *J. Immunol.*, vol. 172, pp. 5823-5827, 2004.
- [495] J. P. Moorman, C. L. Zhang, L. Ni, C. J. Ma, Y. Zhang, X. Y. Wu, P. Thayer, T. M. Islam, T. Borthwick and Z. Q. Yao, "Impaired hepatitis B vaccine responses during chronic hepatitis C infection: involvement of the PD-1 pathway in regulating CD4(+) T cell responses," *Vaccine*, vol. 29, pp. 3169-3176, 2011.
- [496] M. D'Souza, A. P. Fontenot, D. G. Mack, C. Lozupone, S. Dillon, A. Meditz, C. C. Wilson, E. Connick and B. E. Palmer, "Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4+ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction," *J. Immunol.*, vol. 179, no. 3, pp. 1979-1987, 2007.

- [497] S. Vendetti, J. G. Chai, J. Dyson, E. Simpson, G. Lombardi and R. Lechler, "Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells," *J. Immunol.*, vol. 165, no. 3, pp. 1175-1181, 2000.
- [498] Y. Fang, S. Yu, J. S. Ellis, T. Sharav and H. Braley-Mullen, "Comparison of sensitivity of Th1, Th2, and Th17 cells to Fas-mediated apoptosis," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 87, pp. 1019-1028, 2010.
- [499] F. Biagi, C. Badulli, G. E. Feurle, C. Muller, V. Moos, T. Schneider, T. Marth, J. Mytilineos, F. Garlaschelli, A. Marchese, L. Trotta, P. I. Bianchi, M. D. Stefano, A. L. Cremaschi, A. D. Silvestri, L. Salvaneschi, M. Martinetti and G. R. Corazza, "Cytokine genetic profile in Whipple's disease," *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, p. , 2012.

7 Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

K. Schinnerling, V. Moos, A. Geelhaar, K. Allers, C. Loddenkemper, J. Friebel, K. Conrad, A. A. Kühl, U. Erben und T. Schneider, „Regulatory T Cells in Patients with Whipple's Disease“, *J. Immunol.*, Bd. 187, pp. 4061-4067, 2011.

V. Moos, G. E. Feurle, K. Schinnerling, A. Geelhaar, J. Friebel, K. Allers, A. Moter, J. Kikhney, C. Loddenkemper, A. A. Kühl, U. Erben, F. Fenollar, D. Raoult, T. Schneider, „Immunopathology of immune reconstitution inflammatory syndrome in Whipple's disease“, *J. Immunol.*, Bd. 190, pp. 2354-2361, 2013.

Weitere Publikationen, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit entstanden:

G.E. Feurle, V. Moos, K. Schinnerling, A. Geelhaar, K. Allers, F. Biagi, H. Bläker, A. Moter, C. Loddenkemper, A. Jansen, T. Schneider, „The Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in Whipple Disease: A Cohort Study“, *Ann. Intern. Med.*, Bd. 153(11), pp. 710-717, 2010.

A. Geelhaar, V. Moos, K. Schinnerling, K. Allers, C. Loddenkemper, F. Fenollar, B. LaScola, D. Raoult und T. Schneider, „Specific and nonspecific B-cell function in the small intestines of patients with Whipple's disease“, *Infect. Immun.*, Bd. 78(11), pp. 4589-4592, 2010.

V. Moos, C. Schmidt, A. Geelhaar, D. Kunkel, K. Allers, K. Schinnerling, C. Loddenkemper, F. Fenollar, A. Moter, D. Raoult, R. Ignatius und T. Schneider, “Impaired immune functions of monocytes and macrophages in Whipple's disease”, *Gastroenterology*, Bd. 138(1), pp. 210-220, 2010.

A. Geelhaar, K. Schinnerling, J. Friebel, K. Conrad, K. Allers, T. Schneider und V. Moos, “Evaluation of arginine metabolism for the analysis of M1/M2 macrophage activation in human clinical specimens”, *eingereicht*

Vorarbeiten und Teile der Arbeit wurden in Vorträgen oder Postern auf folgenden Kongressen präsentiert:

European Congress of Immunology (ECI) 2008 in Berlin (Poster):

K. Schinnerling, A. Geelhaar, V. Moos, K. Conrad, K. Allers and T. Schneider, “T cell regulation in patients with Whipple's disease”

40. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) 2010 in Leipzig (Vortrag und Poster):

K. Schinnerling, A. Geelhaar, V. Moos, K. Conrad, K. Allers and T. Schneider, “Inefficient T cell priming by dendritic cells impairs *T. whipplei*-specific Th1 response in Whipple's disease”

7th European Mucosal Immunology Group meeting (EMIG) 2010 in Amsterdam (Poster):

K. Schinnerling, A. Geelhaar, V. Moos, K. Conrad, K. Allers and T. Schneider, “Anti-inflammatory milieu induces unspecific T cell regulation in Whipple's disease”

Joint Annual Meeting SIICA DGfI 2011 in Riccione (Poster):

K. Schinnerling, A. Geelhaar, T. Schneider, J. Friebel, K. Conrad, K. Allers, C. Loddenkemper and V. Moos, „Semi-mature dendritic cells fail to induce a *T. whipplei*-specific Th1 response in Whipple's disease”

8 Danksagung

Von ganzem Herzen danken möchte ich Thomas Schneider für die Betreuung meiner Arbeit, das rege Interesse an meinen Ergebnissen und die ergiebigen Diskussionen.

Prof. Dr. Blankenstein danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit, seine Offenheit und die hilfreichen Anregungen bei SFB-Treffen.

Mein besonderer Dank gilt Verena Moos für die persönliche und umsichtige Betreuung, ihre vielen hilfreichen Tipps, das Korrekturlesen meiner Arbeit und dafür, dass sie wirklich zu jeder Zeit ein offenes Ohr für kleinere und größere Probleme hatte.

Ein ganz lieber Dank geht an die gesamte AG Schneider: Diana Bösel, Anika Geelhaar, Julian Friebe, Martina Seipel, Mira Fehr, Kristina Conrad, Nadine Gehrmann und Kristina Allers für eine wunderbare Zusammenarbeit. Insbesondere der Labor-Crew danke ich für ihre helfenden Hände (ohne die das Arbeitspensum an manchen Tagen nicht zu schaffen gewesen wäre), die unermüdlich gute Laune und die unvergesslichen kreativen Püschchen mit Keksen, Kuchen oder Eis...

Mein Dank richtet sich auch an die immunologischen Arbeitsgruppen des Karl-Landsteiner-Hauses. Hier möchte ich insbesondere Rainer Glauben für seine Geduld bei der „Problembehandlung“ am FACS Canto und sein Engagement bei der Organisation wissenschaftlicher Seminare danken. Ulrike Erben danke ich für die konstruktive Kritik, die mir stets wichtige Denkanstöße für meine Arbeit gab.

Ebenfalls danken möchte ich Christoph Loddenkemper für die kompetente pathologische Beratung.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern für die Liebe und Fürsorge, das Verständnis und die Unterstützung bei all meinen Vorhaben.

In allen Phasen meiner Doktorarbeit war mein Mann Julio immer für mich da. Ihm danke ich für sein Verständnis (wenn es mal wieder länger im Labor gedauert hat oder die Zellen am Wochenende gefüttert werden mussten), die Aufmunterung beim Schreiben und seinen unerschütterlichen Glauben an mich.

DANKE!!!